

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Dr. D. C. Bröring)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG DER MURINEN *LITH 1*
KANDIDATENGENE *ABCB11* UND *LXRA* BEIM
HUMANEN GALLENSTEINLEIDEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SOEREN LIEB
aus
Henstedt - Ulzburg
(Kiel 2009)

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Schafmayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Krawczak

Tag der mündlichen Prüfung: 31. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31. August 2009

gez.: Prof. Dr. Rose-John
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle 1: Prävalenz der Gallensteinerkrankung verschiedener ethnischer Gruppen

Tabelle 2: Cholezystektomien im *popgen*-Gebiet 2004

Tabelle 3: Überblick über das Teilnehmerkollektiv

Tabelle 4: Überblick über das Probandenkollektiv

Tabelle 5: Ergebnisse der Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *ABCB11*-Gen

Tabelle 6: Ergebnisse der Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *LXRA*-Gen

Verzeichnis der Abbildungen:

Abbildung 1: Kandidatengene im Maussystem

Abbildung 2: Genetische Kopplung

Abbildung 3: Genetische Assoziation

Abbildung 4: Vierfeldertafel

Abbildung 5: Genetische Marker

Abbildung 6: Chromosom 2

Abbildung 7: Chromosom 11

Abbildung 8: Studienpower

Abbildung 9: *ABCB11*-Genstruktur, Lage der ausgewählten SNPs und
Kopplungsungleichgewicht

Abbildung 10: *LXRA*-Genstruktur, Lage der ausgewählten SNPs und
Kopplungsungleichgewicht

Abbildung 11: Genregion *Lith1* auf Chromosom 2 der Maus

Abbildung 12: Fragebogen für die Erhebung der Gallensteinerkrankung

Abbildung 13: Einverständniserklärung

Abbildung 14: Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Abbildung 15: Fragebogen der Kontrollgruppe

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Cholelithiasis	1
1.1.1	Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2	Epidemiologie	4
1.1.3	Klinik	4
1.1.3.1	Symptome bei akuter Cholezystitis	5
1.1.3.2	Komplikationen	5
1.1.3.3	Risikofaktoren	6
1.1.4	Diagnostik	10
1.1.5	Therapie	11
1.1.5.1	Behandlung einer asymptomatischen und symptomatischen Cholelithiasis	11
1.1.5.2	Chirurgische Therapie der sympt. Cholelithiasis und Cholezystitis	12
1.1.5.3	Konservative Therapie der sympt. Cholelithiasis	12
1.2	Molekulargenetische Befunde zur Cholelithiasis	13
1.2.1	Mausstudien	13
1.2.2	Humane Befunde.....	15
1.3	Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen.....	16
1.3.1	Komplexe Erkrankungen.....	16
1.3.2	Kopplung und Assoziation	17
1.3.3	Fall-Kontroll-Studie	19
1.3.4	Positionsklonierung und Positionskandidaten	20
1.3.5	Genetische Marker	21
1.3.5.1	Blockstruktur des menschlichen Genoms (Haplotyp-Blockstruktur)	22
1.3.5.2	Internationales HapMap Projekt	23
1.4	Die Kandidatengene <i>ABCB11</i> und <i>LXRA</i>	23
1.4.1	<i>ABCB11</i>	24
1.4.2	<i>LXRA</i>	25
1.5	Zielsetzung.....	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Patientenkollektiv	26
2.1.1	Einschlusskriterien	26
2.1.2	Rekrutierungsplattform <i>popgen</i>	26
2.1.3	Rekrutierung.....	29
2.1.4	Kontrollgruppe	29
2.1.5	Datenschutz und Ethik	30
2.2	Genotypisierung	30
2.2.1	DNA-Extraktion.....	30
2.2.2	Whole genome Amplification (WGA)	31
2.2.3	Genotypisierung mit dem SNPlex System	32
2.2.4	Auswahl der SNPs.....	33
2.3	Analyse.....	34

3	Ergebnisse.....	35
3.1	Patientenkollektiv	35
3.2	Studienpower.....	36
3.3	Kandidatengene.....	37
3.3.1	<i>ABCB11</i>	37
3.3.1.1	Analyse der Einzelpunktassoziationen für <i>ABCB11</i>	39
3.3.1.2	Analyse der Haplotypen für <i>ABCB11</i>	39
3.3.2	<i>LXRA</i>	41
3.3.2.1	Analyse der Einzelpunktassoziationen für <i>LXRA</i>	42
3.3.2.2	Analyse der Haplotypen für <i>LXRA</i>	42
4	Diskussion.....	43
4.1	Relevanz der Gallensteinerkrankung.....	43
4.2	Genetik der Gallensteinerkrankung.....	44
4.3	Die <i>Lith</i> -Genregion.....	45
4.4	Kohorte	48
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	52
7	Anhang.....	68
8	Danksagung.....	79
9	Lebenslauf	80

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Zusammenhang zwischen der humanen Gallensteinerkrankung mit zwei funktionellen murinen Kandidatengenen, *ABCB11* und *LXRA*, überprüft. Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit der Pathogenese und Klinik der Gallensteinerkrankung, insbesondere mit Studien über epidemiologische und familiäre Häufungen. Ferner wird auf molekulargenetische Untersuchungen eingegangen, die eine genetische Komponente der Krankheit zeigen konnten.

1.1 Cholelithiasis

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Bei Gallensteinen (Gallenkonkrementen, Cholelithiasis aus dem griechischen: Chole = Galle; lithos = Stein) handelt es sich um ein festes, kristallisiertes Ausfallprodukt der Galle. Dieses Ausfallprodukt kann primär in der Gallenblase (Cholezystolithiasis) oder den Gallenwegen (Choledocholithiasis) entstehen, bzw. sekundär in diese eingewandert sein. Bei primär in den Gallengängen entstandenen Gallensteinen handelt es sich in 5 - 40% der Fälle um braune Pigmentsteine, bei den sekundär aus der Gallenblase eingewanderten Konkrementen hingegen hauptsächlich, in 60 - 95% der Fälle, um Cholesterinsteine, die in den Gängen erheblich an Größe zunehmen können (Pigmentsteine mit Cholesterinkern) (*Sauerbruch et al. 1986/1994; Thistle 1998*). In einer weiteren Studie, in der bei 1025 symptomatischen Gallensteinträgern im nördlichen Schleswig-Holstein nach Cholezystektomie die Gallensteine untersucht wurden, konnte ein dramatischer Wandel in der Gallensteinzusammensetzung dargelegt werden. In dieser Studie waren 91% der Gallensteine Cholesterinsteine, jedoch nur 2% Pigmentsteine zu finden. Bei einem BMI über 30 kg/m² steigt die Prozentzahl sogar auf über 95% (*Schafmayer et al. 2006*). Cholesterinsteine sind eher hell und bestehen definitionsgemäß zu mehr als 70% aus auskristallisiertem Cholesterin. Pigmentsteine sind eher dunkle Steine und beinhalten hauptsächlich Bilirubin und weniger als 20% Cholesterin. Das Entstehen von Cholesterinsteinen ist multifaktoriell. Es geschieht durch eine Übersättigung der Galle mit Cholesterin im Verhältnis zu Gallensäuren und Phospholipiden, welche die normale Galle in gemischten Mizellen in Lösung halten. Dabei lagern sich die wasserlöslichen Anteile der

Gallensäuren nach außen und halten das an sich unlösliche Cholesterin in Lösung. Das Verhältnis von Gallensäuren zu Cholesterin beträgt normalerweise 20:1. Bei Konzentrationsabfall von Gallensäuren oder Phospholipiden kann weniger Cholesterin in Lösung gehalten werden. Eine erhöhte Cholesterinkonzentration hat den gleichen Effekt. Die Cholesterinsteinbildung beginnt ab einem Gallensäuren-Cholesterin-Verhältnis von unter 13:1 (*Admirand et al. 1968; Hay et al. 1990; Hofmann et al. 1988*).

Weitere Faktoren, die zu Steinentwicklung führen, sind die Hypomobilität der Gallenblase, was eine verlängerte Verweildauer der Galle in der Gallenblase zur Folge hat oder eine unvollständige Entleerung mit Anwesenheit von pronukleirenden Faktoren (z.B. Muzin, Kalzium). Die Kontraktion der Gallenblase wird hauptsächlich durch das Hormon Cholezystokin, gebildet in den I-Zellen des Duodenums, gesteuert, aber auch cholinerg über Vagusstimulation. Hierbei ist eine Störung der Motilität zum Beispiel durch eine autonome Neuropathie im Rahmen eines Diabetes mellitus möglich (*Hay et al. 1990; Hoffmann et al. 1988; Xiao et al. 1999*). Ferner wird die Gallenblasenmotilität durch einen erhöhten Triglyceridspiegel gestört. Hierbei wird die Ansprechbarkeit auf Cholezystokin vermindert, die bei Normalisierung der Triglyceridspiegel allerdings reversibel ist (*Jonkers et al. 2003*). Nicht zu vergessen sind die übrigen Risikofaktoren wie erbliche Belastungen, Geschlecht, Alter, Ernährung und bestimmte Erkrankungen (siehe hierzu Abschnitt 1.1.3.3).

Die Entstehung der braunen Pigmentsteine nimmt meistens durch eine bakterielle Besiedlung ihren Ursprung. Diese Bakterien produzieren einerseits β -Glucuronidasen, welche Bilirubindiglukuronide dekonjugieren, und andererseits Enzyme, welche die Mizellen schädigen. Zusätzlich werden Glykoproteine gebildet, die zu vermehrter Steinbildung führen (*Stewart et al. 2000*). Seltener können Pigmentsteine durch die Sekretion von Enzymen aus der Leber (*Lopez del Pino et al. 1981*) oder um Wurmeier, sowie Parasiten entstehen. Durch die dadurch gehäuft auftretenden Infektionen der Gallenwege im Orient und Japan, kommen diese Steine dort häufiger als in der westlichen Welt vor (*Leuschner et al. 1986; Masuda et al. 1979; Nagase et al. 1980*).

Schwarze Pigmentsteine werden in Steine ohne Calciumcarbonat, bestehend hauptsächlich aus Bilirubin, und in Steine mit Calciumcarbonat, bzw. nur aus Calciumcarbonat bestehende unterteilt. Bilirubinsteine entwickeln sich in der Regel infolge einer Übersättigung der Galle mit Bilirubin. Sie beinhalten zum größten Teil Bilirubinpigment. Bilirubin ist ein

Blutfarbstoff, der beim Abbau des Hämoglobins aus den Erythrozyten entsteht und über die Galle und dann über den Darm ausgeschieden wird. Teilweise wird das Bilirubin und seine Abbauprodukte im terminalen Ileum rückresorbiert. Dieses ist der so genannte enterohepatische Kreislauf, in dem die Stoffe über die Pfortader wieder zur Leber gelangen. Die Bilirubinlöslichkeit wird im wesentlichen durch den pH-Wert, den Gallensalzen, dem Calcium, dem Cholesterin und den Proteinen in der Galle beeinflusst. Erkrankungen, die einen erhöhten Abbau von Erythrozyten auslösen (Hämolyse), haben eine verstärkte Bilirubinbildung zur Folge, was wiederum einen Konzentrationsanstieg von Bilirubin in der Galle verursacht, so dass dieses nicht mehr in Lösung gehalten werden kann. Hierdurch kommt es zur Ausfällung und damit zur Pigmentsteinbildung. Eine wesentliche Erkrankung ist hierbei die Leberzirrhose, bei der ein niedriger Gallensäurespiegel ein wichtiger Faktor ist. In schwarzen Pigmentgallensteinen liegt das Bilirubin überwiegend als Calciumbilirubinat vor, so dass dieses Salz einen großen Anteil an deren Entstehung hat (*Li et al. 2000; Soloway et al. 1977; Trotman 1979*). Ein weiterer Faktor könnten Ernährungsgewohnheiten sein. So konnte in Japan ein Anstieg der schwarzen Pigmentgallensteine in einem Zeitraum von 40 Jahren von nahezu 0% auf 7% beobachtet werden, während die Häufigkeit von braunen Pigmentgallensteinen von 60% auf 24% abfiel. In diesen vierzig Jahren zog ein eher westlicher Lebensstil mit entsprechenden Essgewohnheiten, mit vielen Proteinen und raffinierten Kohlenhydraten, in Japan ein (*Nagase et al. 1978; Nagase et al. 1980*).

Zu den Calciumcarbonatsteinen kann gesagt werden, dass Calciumcarbonat als Bestandteil aller Gallensteinarten vorkommen kann. Jedoch gibt es auch reine Calciumcarbonatsteine oder solche, die aus unterschiedlichen Polymorphismen des Calciumcarbonats bestehen können. Ihre Entstehung ist nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es Hinweise, dass ein Verschluss des Ductus cysticus die Entstehung solcher Steine begünstigt (*Wolpers et al. 1993*). Durch den Verschluss steigt der Druck in der Gallenblase an, so dass mehr Calciumcarbonat eintritt (*Svanvik et al. 1981*). Hinzu kommt die hohe Magnesiumkonzentration in der Galle. Die Größe aller Gallensteine, egal ob Cholesterin oder Pigmentsteine, variiert zwischen einigen Millimetern, auch Sludge oder Gries genannt, bis hin zu einigen Zentimetern großen, soliden Steinen.

1.1.2 Epidemiologie

Die Gallensteinerkrankung ist die in der Bevölkerung der westlichen Welt (Europa, Australien, Nordamerika) am häufigsten anzutreffende Krankheit der Gallenblase und Gallenwege. In den USA wurden bei Autopsien von über 40-jährigen bei 8% der Männer und 20% der Frauen Gallensteine nachgewiesen (*Johnston und Kaplan 1993*). Im Alter von 75 Jahren haben 20% der Männer und 35% der Frauen Gallensteine (*Ransohoff und Gracie 1993*). In einer prospektiven dänischen Studie (*Jensen und Jorgensen 1991*) konnte gezeigt werden, dass sich die Prävalenz bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter erhöht. Man geht darin von einer Erhöhung um 3% alle 5 Jahre aus. Es ist also durch die steigende Lebenserwartung davon auszugehen, dass die Prävalenz von Gallensteinträgern weiter zunehmen wird. Meist manifestiert sich die Krankheit nach dem 20. Lebensjahr.

1.1.3 Klinik

Circa 75% der Gallensteinträger sind asymptomatisch und weisen demzufolge keine Beschwerden auf. Oft werden bei diesen Patienten im Rahmen von Routinesonographien Gallensteine entdeckt. 60-80% der Steinträger bleiben im Verlauf ihres Lebens asymptomatisch. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich Symptome entwickeln, beträgt in den ersten zehn Jahren nach Diagnosestellung 2-4% pro Jahr und halbiert sich in den darauf folgenden Jahren auf 1-2% (*Gracie und Ransohoff 1982; Friedman, Raviola und Fireman 1989*). Andere Studien gehen sogar von noch einmal halbierten Werten aus. Das Risiko, dass sich biliäre Komplikationen entwickeln liegt bei 0,1-0,2% pro Jahr (*Ransohoff and Gracie 1993; Attili et al.*).

Aber circa ein Viertel aller Gallensteinträger entwickelt sehr wohl Symptome (symptomatische Cholelithiasis). Von diesen 25% entwickelt die Hälfte der Patienten innerhalb des ersten Jahres wiederholte Schmerzen (*Thistle et al 1984; Friedman, Raviola und Fireman 1989*). Das Risiko minimiert sich allerdings nach fünf Jahren ohne Symptomatik auf das eines asymptomatischen Steinträgers. Das Risiko einer weiteren Gallenkolik nach einer stattgehabten Episode beträgt aber insgesamt 70%. Die jährliche Komplikationsrate bei diesen Patienten beträgt 1-2% (*beide Thistle et al. 1984*).

Charakteristische Symptome für Gallensteine sind, abgesehen von Komplikationen, erneuerliche Schmerzattacken (Gallenkolik) von mehr als 15 Minuten Dauer, die sich im

Epigastrium oder auch dem rechten Oberbauch manifestieren. Diese Schmerzen können in den Rücken ausstrahlen und auch in die rechte Schulter. Oft bestehen zusätzlich Übelkeit und/oder Erbrechen, sowie unspezifische Nahrungsmittelunverträglichkeiten.

Weitere Symptome, die nicht spezifisch für ein Gallensteinleiden sind, können Flatulenz, Sodbrennen mit saurem Aufstoßen, Druck und Völlegefühl, sowie Fettunverträglichkeit sein.

1.1.3.1 Symptome bei akuter Cholezystitis

Eine akute Cholezystitis geht meist mit Schmerzen im rechten Oberbauch einher. Zusätzlich können eine schmerzhafte Abwehrspannung und Fieber bestehen. Die typischen Schmerzen bei einer akuten Cholezystitis dauern länger als drei Stunden und wandern dann vom Epigastrium zum rechten oberen Quadranten des Abdomens (*Ahmed et al. 2000*). Bis zu 15% der Patienten hat zusätzlich einen Ikterus und bei einem Drittel kann die geschwollene Gallenblase schmerzhaft getastet werden (Murphy-Zeichen). Als Laborparameter bestehen meist eine Leukozytose, erhöhte Werte für BSG und CRP, sowie erhöhte Leberenzyme.

1.1.3.2 Komplikationen

Das Risiko von biliären Komplikationen, durch Gallenblase oder Gallenwege verursacht, nach einer Gallenkolik beträgt 1-2% pro Jahr (*Ransohoff und Gracie 1993; Thistle et al. 1984*), bei asymptomatischen Patienten mit Gallensteinen nur 0,1-0,2% (*Ransohoff und Gracie 1993; Attili et al. 1995*).

Zu den biliären Komplikationen zählen die Cholangitis und akute Cholezystitis, die die häufigste Komplikation bei Gallenblasensteinpatienten ist. Ursache der Entzündung ist eine bakterielle Infektion der Gallenblase und -wege, welche oftmals durch *E. coli* oder Enterokokken verursacht wird. Weitere Komplikationen sind Verschluss des Ductus cysticus oder des Ductus Choledochus mit Gallenblasenkoliken, bakterieller Cholezystitis bzw. Cholangitis (Entzündung der extra- und intrahepatischen Gallengänge), Gallenblasenhydrops bis zur Perforation der Gallenblase. Daraus folgende Komplikationen können Gallenblasenempyem, gangränöse Cholezystitis und Sepsis sein. Zusätzlich können sich hieraus weitere Komplikationen wie biliärer Verschlussikterus, eine sekundäre biliäre Leberzirrhose, Leberabszesse und eine biliäre Pankreatitis entwickeln.

Weitere schwerwiegende Komplikationen können eine Steinperforation in den Darmtrakt (Gallensteinileus), gedeckte Perforation mit subhepatischem Abszeß oder eine Perforation in

die freie Bauchhöhle mit galliger Peritonitis sein. Hinzu kommen die chronisch-rezidivierende Cholezystitis mit Schrumpfgallenblase, Verkalkung der Gallenblasenwand (Porzellangallenblase) und Gallenblasenkarzinom. Das Risiko hierfür ist bei männlichen Patienten mit Steinen über 3 cm um das 9 bis 10 fache erhöht (*Diehl 1983; Lowenfels et al. 1985, 1989; Soetniko und Carr-Locke 1998; Ahmed et al. 2000; Csendes et al. 2000*).

1.1.3.3 Risikofaktoren

Personen mit bestimmten Konstellationsprofilen neigen häufig zur Bildung von Gallensteinen. Die ursächlichen Rollen spielen hierbei Gallestau, der die Mikrokristallisation fördert, Hypomotilität der Gallenblase und eine gegenüber der Norm veränderte Gallezusammensetzung.

Grundlegend lassen sich die Risikofaktoren mit der 5F-Regel (female, fat, forty, fecund, family) beschreiben:

Das weibliche Geschlecht hat gegenüber dem männlichen ein um den Faktor 2-3 erhöhtes Risiko an Gallensteinen zu erkranken (*Acalovschi et al. 2003; Timmer et al. 2000; Nakeeb et al. 2002*). 20% der Frauen und circa 8% der Männer entwickeln Gallensteine (*Johnston and Kaplan 1993*). Dies scheint daran zu liegen, dass die spezifische Verteilung der Geschlechtshormone, die unter anderem aus Cholesterin gebildet werden und wieder zu Cholesterin abgebaut werden, die Cholesterinsteinbildung begünstigt. Hierbei spielt das Verhältnis zwischen Cholesterin und Gallensäuren eine entscheidende Rolle.

Übergewicht ist vor allem im Hinblick auf den hierbei häufig gestörten Fettstoffwechsel mit einer erhöhten Konzentration von Cholesterin im Blut ein Risikofaktor. Zusätzlich vermindert Adipositas die Gallenblasenentleerung und vermindert den Säureanteil in der Galle. Schon ein Übergewicht von 20% verdoppelt das Gallensteinrisiko (*Jorgensen 1989; Barbara et al. 1987; Stampfer et al. 1992*). Ein hilfreicher Marker hierfür ist der Body Mass Index (BMI). Mit steigendem BMI wächst auch das Risiko an Gallensteinen zu erkranken (*Völzke et al. 2005; Torgerson et al. 2003; Nakeeb et al. 2002; Kratzer et al. 1997*). Hinzu kommen Faktoren der Ernährung: Eine cholesterinreiche, hyperkalorische Nahrungszufuhr führt zu einem Anstieg des Cholesterins im Blut und begünstigt hierdurch die Entstehung von Cholesterinsteinen. Hierfür scheint ein niedriger HDL-Cholesterinspiegel ursächlich zu sein (*Völzke et al. 2005; Thijs et al. 1990; Barbara et al. 1987; The epidemiology of gallstone disease in Rome, ...1988*). Ebenso ist eine ballaststoffarme Ernährung, durch die verzögerte Nahrungspassage im Darm mit gesteigerter Fettresorption ins Blut und hierdurch

ansteigendem Blutcholesterin, ein entscheidender Risikofaktor. Bei totaler parenteraler Ernährung und Fasten verändert sich die Gallezusammensetzung und vermindert sich die Gallenblasenentleerung, so dass es hierin häufig zur Entstehung von Sludge kommt (*Angelico und Della Guardia 2000*). Ein schneller Gewichtsverlust und die damit verbundene Metabolisierung von Fett veranlasst die Leber zusätzliches Cholesterin in die Galle zu sezernieren.

Mit **höherem Lebensalter** nimmt die Häufigkeit von Gallensteinen zu (*Barbara et al. 1987; Völzke et al. 2005; The epidemiology of gallstone disease in Rome, ...1988*). *Berndt et al.* konnten 1989 in einer Studie zeigen, dass die Prävalenz von Gallensteinträgern in der Altersgruppe der über 65 jährigen bei 30 - 35% lag, bei der Gesamtbevölkerung hingegen bei nur 20%. Die größte Krankheitshäufigkeit wies hiernach die Gruppe der Frauen zwischen 70 und 79 Jahren mit 57% auf. Dies lässt sich mit der vermehrten Exkretion von Cholesterin bei niedrigerer Gallensäurekonzentration im Alter erklären. **Schwangerschaft** (*Barbara et al. 1987; The epidemiology of gallstone disease in Rome, ...1988*) und **Östrogeneinnahme** (*Gallbladder disease... 1977*), zum Beispiel im Rahmen einer Hormonersatztherapie oder als Ovulationshemmer, spielen aus den gleichen Gründen, wie die bei den Risikofaktoren des weiblichen Geschlechtes genannten (siehe oben) eine Rolle bei der Entstehung von Gallensteinen: Östrogene erhöhen den Cholesterinanteil in der Galle und Progesteron vermindert die Motilität der Gallenblase, was zur Stase und folgender Eindickung der Galle führt.

Familiäre Häufung (family, genetische Risiken) ist der fünfte Punkt der 5F-Regel, da Gallensteine oftmals gehäuft in einer Familie auftreten, so dass man von einer erblichen Disposition ausgehen kann. Allerdings sind die genauen Faktoren noch weitgehend unbekannt. Doch haben Menschen mit angeborenen Fettstoffwechselstörungen, bei denen der Körper, neben der Cholesterinaufnahme aus der Nahrung, zu viel eigenes Cholesterin bildet, ein erhöhtes Risiko der Gallensteinbildung. Studien haben beispielsweise ergeben, dass der hispanische Anteil der US-amerikanischen Bevölkerung ein erhöhtes Risiko gegenüber der nicht hispanischen Bevölkerung hat, Gallensteine zu entwickeln (*Everhart et al. 1999; Maurer et al. 1989*). Weitere Studie haben ergeben, dass die Pima Indianer, ein Stamm im südlichen Teil der Vereinigten Staaten (Arizona), mit einer Prävalenz von 50% besonders häufig vom Gallensteinleiden betroffen sind, obwohl deren Ernährungsgewohnheiten denen der übrigen nordamerikanischen Bevölkerung gleichen, die allerdings mit einer Prävalenz von nur 20% betroffen sind. Bei den Massai hingegen, einer Bevölkerungsgruppe in Ostafrika kommt das Gallensteinleiden praktisch gar nicht vor (*Sampliner et al. 1970; Grimaldi et al.*

1993; Thistle et al. 1971; Thistle and Schoenfield 1971). Bei den Mapuche Indianern, einem chilenischen Eingeborenenstamm, kommen gehäuft fast nur Cholesteringallensteine vor (Galman et al. 2004). Insgesamt ist das Auftreten der Gallensteinerkrankung weltweit sehr heterogen. In fast allen europäischen Ländern, sowie Nord- und Südamerika sind Gallensteine weit verbreitet. In Asien und Afrika ist deren Auftreten eher selten (einen Überblick über die Prävalenzen verschiedener Länder gibt Tabelle 1). Weiterhin konnte das prinzipielle Vorhandensein genetischer Risikofaktoren durch ethnische Häufigkeitsunterschiede, sowie durch Familien- und Zwillingsstudien belegt werden. In Familienstudien zeigte sich, dass Geschwister erkrankter Personen ein um den Faktor 3 erhöhtes Risiko haben, ebenfalls an Gallensteinen zu erkranken (van der Linden und Simonson 1973a, 1973b). Bei Verwandten ersten Grades mit Gallensteinen konnte mit Hilfe des Ultraschalls eine Häufigkeit von 21% gegenüber 9% bei alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen nachgewiesen werden (Gilat et al. 1983). In einer aktuellen Studie, in der 2474 Patienten nach Cholezystektomie zusätzlich über familiäre Gallensteinhäufung befragt wurden, konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko von Geschwistern, an Gallensteinen zu erkranken, signifikant mit dem Erkrankungsalter des Indexpatienten zusammenhängt. So ist das Risiko für Geschwister von Patienten mit einem Erkrankungsalter von unter 20 Jahren gegenüber der Gruppe, in der das Erkrankungsalter im Mittel 65 Jahre alt war, um den Faktor 111,8 erhöht (Schafmayer et al. 2008).

Tabelle 1: Prävalenz der Gallensteinerkrankung verschiedener ethnischer Gruppen

Kontinent	Land	Studie	Jahr	Kohorten- größe	Gesamtprävalenz
Europa	Dänemark	Jørgensen et al.	1984	3608	8,8%
	England	Heaton et al.	1989	1896	7,5%
	Deutschland	Berndt et al.	1987	3226	19,6%
	Italien	Attili et al.	1987	29584	13,8%
	Norwegen	Glabek et al.	1983	1371	21,9%
Asien	Bangladesch	Dhar et al.	1995	1058	5,4%
	China	Zhao et al.	1990	15856	3,5%
	Indien	Khuroo et al.	1988	1104	6,1%
	Iran	Massarrat	2000	1882	4,7%
	Japan	Nomura et al.	1984	2584	3,2%

	Sibirien	Reshetnikov et al.	1995	1678	6,4%
	Thailand	Prathnadi et al.	1990	6146	3,1%
Amerika	Argentinien	Brasca et al	1999	1173	20,5%
	Brasilien	Coelho et al.	1999	1000	9,3%
	Chile	Covarrubias et al.	1994	1699	28,5%
	Peru	Moro et al.	1997	2427	14,3%
	US Indianer	Everhart et al.	1995	3296	51%
	US Schwarze	Everhart et al.	1994	4212	14,3%
Afrika	Nigeria	Akute et al.	1998	670	1,8%
	Soweto	Walker et al.	1989	100	10%
	Tunesien	Safer et al.	1990	1123	4%

Die Tabelle zeigt die Gesamtprävalenz verschiedener Länder, aufgeteilt nach Kontinenten. Zusätzlich sind die Studienautoren, das Jahr der Veröffentlichung und die Kohortengröße der untersuchten Population angegeben (nach *Lammert und Sauerbruch 2005*)

Insgesamt scheint die Gallensteinerkrankung das Ergebnis aus dem komplexen Zusammenwirken genetischer Faktoren mit einhergehender kohlenhydrat- und fettreicher, sowie ballaststoffarmer Ernährung zu sein. Dazu kommen noch nicht endgültig geklärte Umweltfaktoren, zu denen auch mangelnde Bewegung zählt (*Lammert und Sauerbruch 2005*).

Ein weiterer Risikofaktor, der nicht in der 5F-Regel berücksichtigt ist, ist das **Gallensäureverlustsyndrom**. Deren Mangel oder Verlust, zum Beispiel bei gastroenterologischen Erkrankungen, kann ebenfalls zur Ausfällung des Cholesterins führen, da es nicht mehr in Lösung gehalten werden kann. Normalerweise werden die Gallensäuren, nachdem sie ihre Aufgabe bei der Fettverdauung erfüllt haben, größtenteils im terminalen Ileum wieder aufgenommen. Über die Pfortader gelangen sie wieder in die Leber. Bei diesem so genannten enterohepatischen Kreislauf gelangen etwa 96% der Gallensäuren wieder zurück in die Leber, während nur etwa 4% über die Faeces verloren geht. Wenn jetzt diese Rückresorption zum Beispiel durch Entzündungen, wie beim Morbus Crohn, oder nach operativer Entfernung (resultierend: Kurzdarmsyndrom), gestört ist, gehen die Gallensäuren über den Stuhl verloren. Die Leber ist nicht in der Lage, diesen Verlust auszugleichen, so dass der Anteil der Gallensäuren in der Galle sinkt und das Verhältnis zum Cholesterin verändert ist. Hierdurch kommt es zu einer unzureichenden Mizellenbildung in der Galle, so dass die

Lösungsfähigkeit für Cholesterin abnimmt. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Resorption von unkongjugiertem Bilirubin im Kolon, was die Gefahr der Bildung von Pigmentsteinen erhöht (*Andersson et al. 1987; Brink et al. 1999*).

Weitere Risikofaktoren sind die Einnahme bestimmter Medikamente, wie Clofibrat, fortgeschrittene Lebererzirrhose, Hyperthyreose (*Inkinen, Sand und Nordback 2000*) und (chronische) Hämolyse (*Aydogdu et al. 2001; del Giudice et al. 1999; Usui et al. 1991*).

Clofibrat senkt den Cholesterinanteil im Blut, erhöht aber den Anteil in der Galle (*Gallbladder disease as a side effect... 1977*).

Bei der fortgeschrittenen Leberzirrhose kommt es durch eine autonome Neuropathie, die die Funktion von Gallenblase und Sphincter Oddi beeinträchtigt, zu einer Veränderung der Gallezusammensetzung und folgender Galleblaseentleerung (*Chawla, Puthumana und Thuluvath 2001; Li et al. 2000*).

1.1.4 Diagnostik

Bei Verdacht auf Gallensteine sollte als Basisdiagnostik, zusätzlich neben Anamnese und körperlicher Untersuchung, eine Ultraschalluntersuchung (Sonographie) des Abdomens durchgeführt werden. Die Sonographie weist eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 97% für das Erkennen von Gallensteinen auf (*Shea et al. 1994*). Weitere Befunde bei diesem Verfahren können eine vergrößerte Gallenblase, Gallenblasenwandverdickung (Gallenblasenwandödem) und ein Ödem um die Gallenblase sein, was im Zusammenspiel mit einem eingeklemmten Stein im Ductus cysticus zu einer Kompression des Ductus hepaticus oder Ductus choledochus führen kann (Mirizzi-Syndrom). Ferner sollte eine Laboruntersuchung veranlasst werden, die BSG oder CRP, kleines Blutbild, Gamma-GT, AP, Bilirubin, Transaminasen, sowie eventuell Lipase/Amylase im Serum beinhaltet. Vor einer invasiven Diagnostik (z.B. ERC/ERCP, Operation) müssen zusätzlich die Gerinnungswerte (Thrombozyten, PTT, INR) bestimmt werden, um Blutungsgefahren auszuschließen oder zu minimieren. Abhängig vom klinischen Bild und den Ergebnissen der Voruntersuchungen des Patienten kommen zur weiteren Diagnostik ERC/ERCP, MRC/MRCP, Endosonographie, CT und andere Untersuchungen in Frage. Die endoskopisch-retrograde Cholangio- (Pankreatiko) graphie ist die Methode der Wahl zum Nachweis und zur Therapie von Gallengangssteinen. Hierbei ist nach Möglichkeit die Induktion des Pankreasganges zu vermeiden, da hierdurch die Gefahr besteht, eine Pankreatitis auszulösen. Bei einer kernspintomographischen Darstellung der Gallengänge (MRC) ist im Gegensatz zur ERC

kein invasives Vorgehen nötig, jedoch besteht auch keine Möglichkeit der therapeutischen Intervention. Die Endosonographie kann ebenfalls zum Nachweis von Gallengangssteinen eingesetzt werden, kann jedoch schwierig bei der Darstellung distaler Steine sein. Die Computertomographie (CT) dient als empfindlicher Nachweis einer Gallensteinverkalkung. Sie kann eingesetzt werden, wenn durch Adipositas oder anatomischen Besonderheiten keine ausreichende sonographische Darstellbarkeit erzielt werden kann. Ebenso kann durch die CT ein Empyem oder eine Perforation der Gallenblase ausgeschlossen oder bestätigt werden. Wegen erhöhter Komplikationsrate dient die perkutane, transhepatische Cholangiographie (PTC) lediglich als Reserveverfahren zur therapeutischen Intervention, falls die ERC nicht möglich ist.

1.1.5 Therapie

1.1.5.1 Behandlung einer asymptomatischen und symptomatischen Cholelithiasis

Die asymptomatische Gallensteinerkrankung hat prinzipiell keine Therapieindikation. Jedoch gibt es verschiedene Szenarien, in denen doch eine Therapie durchgeführt werden sollte. Hierzu gehören Patienten mit Porzellangallenblase, Patienten mit schnell wachsenden oder über 1 cm großen Gallenblasenpolypen und Gallensteinen. Ebenso bei asymptomatischen Gallensteinen über 3 cm Durchmesser oder bei Patienten bei denen spezielle abdominelle Eingriffe vorgenommen werden sollen, wie zum Beispiel Ileumbypass, Dünndarmresektionen oder Transplantationen, sollte eine Therapie erwogen werden. Die Therapie wäre in diesen Fällen eine elektive Cholezystektomie.

Die symptomatische Cholezystolithiasis stellt in der Regel eine Indikation zur elektiven Cholezystektomie. Wenn ein Verdacht auf eine Gallenkolik besteht, sollte für mindestens 24 Stunden eine Nahrungskarenz eingehalten werden. Danach sollte eine gesunde Ernährung eingehalten werden, indem auf fette oder gebratene Speisen verzichtet wird. Meistens merken die Patienten selber, was sie vertragen oder was nicht. Sollte die alleinige Nahrungskarenz nicht ausreichend sein, können verschiedene Medikamente zur Spasmolyse eingesetzt werden. Bei leichten Koliken kommen Nitroglyzerin und/oder Butylscopolamin in Frage, die eventuell mit Paracetamol kombiniert werden können. Bei schwereren Koliken sollte ein starkes Analgetikum, zum Beispiel Pethidin, mit Butylscopolamin kombiniert werden. Hierbei ist zu beachten, dass Morphinderivate, außer Pethidin, obsolet sind, da sie einen Spasmus des Sphincter Oddi auslösen können. Sollte zusätzlich eine bakterielle Infektion der

Gallenblase oder der Gallengänge vorliegen, sollten gallegängige Antibiotika eingesetzt werden. Nach dieser Behandlung sollte im symptomfreien Intervall eine elektive Cholezystektomie durchgeführt werden.

1.1.5.2 Chirurgische Therapie der sympt. Cholelithiasis und Cholezystitis

Als Standardtherapie der symptomatischen Gallensteinerkrankung und akuten Gallenblasenentzündung gilt heute die laparoskopische Cholezystektomie. Dieses Verfahren ist wahrscheinlich der offenen Cholezystektomie überlegen (*Vander Velpen et al. 1993; Majeed et al. 1996; Hardy et al. 1994; Downs et al. 1996*). Beim laparoskopischen Verfahren ist die Letalität niedriger (*Steiner et al. 1994*), die postoperative Komplikationsrate (*Strasberg, Hertl und Soper 1995*) sowie die durchschnittliche Krankenhausverweildauer (*Hardy et al. 1994*) und Rekonvaleszenzzeit sind deutlich geringer als beim offenen Verfahren, auch konventionelle Cholezystektomie genannt. Die Gesamtletalität der operativen Entfernung der Gallenblase konnte nach Einführung der laparoskopischen Technik von 1,2% auf 0,7% gesenkt werden (*Ärztammer Nordrhein 1998*). Eine primär offene Cholezystektomie sollte jedoch bei einer gangränösen Cholezystitis, wenn zu erwarten ist, dass Gangstrukturen nur schwer oder nicht zu identifizieren sind, bei Gerinnungsstörungen und beim Mirizzi -Syndrom, einer seltenen Form des Verschluss-Ikterus, einer primär laparoskopischen Cholezystektomie vorgezogen werden. Die akute Cholezystitis sollte möglichst innerhalb von 72 Stunden nach Diagnosestellung früh-elektiv operiert werden. Studien in den 1970er Jahren haben bereits gezeigt, dass in der Regel Operationen innerhalb der ersten 5 Tage nach Diagnosestellung gegenüber Operationen erst nach 6 bis 8 Wochen für den Patienten Vorteile bringen können (*McArthur et al. 1975; van der Linden und Sunzel 1970; Jarvinen und Hastbacka 1980*). Sollte eine früh-elektive Operation aufgrund verspäteter Diagnosestellung oder aus anderen medizinischen Gründen innerhalb der ersten fünf Tage (*Schwesinger, Sirinek und Strodel 1999*) nicht möglich sein, sollte die Operation nach sechs Wochen erfolgen (*Garber et al. 1997*).

1.1.5.3 Konservative Therapie der sympt. Cholelithiasis

Eine konservative Therapie von symptomatischen Gallensteinen ist möglich bei Patienten, die eine Operation ablehnen, oder ein erhöhtes operatives Risiko aufweisen (*Cesmeli et al. 1999; Howard und Fromm 1999*) und kann mittels extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie (ESWL)

oder medikamentöser Litholyse durchgeführt werden. Jedoch sollten diese Verfahren, da sie zum Teil langwierig sind (bis zu einem Jahr zur Steinfreiheit) und ein hohes Rezidivrisiko beinhalten (*Thistle et al. 1984; Friedman, Raviola und Fireman 1989*), nur bei Patienten mit unkomplizierter symptomatischer Gallensteinerkrankung erwogen werden. Außerdem gilt zu beachten, dass die Komplikationen des Gallensteinleidens einer raschen interventionellen Behandlung bedürfen. Vor der Entscheidung, ob eine konservative Therapie durchgeführt werden kann müssen zunächst einige Diagnostikschritte durchlaufen werden. So sollte zu der meistens schon durchgeführten Sonographie eine Steinverkalkung mittels Gallenblasenröntgenzielaufnahme oder der sensitiveren Computertomographie (*Walters et al. 1992*) ausgeschlossen werden. Die Gallenblasenmotilität und Durchgängigkeit des Ductus cysticus sollte durch eine Funktionssonographie beurteilt werden. Eine ESWL kann dann bei Patienten mit solitärem, röntgennegativen Stein bis zu einem Durchmesser von 2 cm und gut kontrahierender Gallenblase durchgeführt werden. Zusätzlich sollte eine adjuvante Litholyse veranlasst werden, um den Erfolg der Behandlung nicht weiter zu minimieren (*Sackmann et al. 1991, 1992; Pauletzki et al. 1994*). Sollten nach erfolgreicher Therapie erneut Symptome auftreten muss eine Sonographie durchgeführt werden. In einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren ist bei mindestens einem Drittel der Patienten ein Steinrezidiv zu erwarten, wovon etwa 60 % symptomatisch werden (*Sackmann et al. 1994*). Dieses sollte dann durch Cholezystektomie behandelt werden, da diese Patienten offensichtlich eine hohe Prädisposition zur Steinentstehung haben, obwohl bei jedem zweiten Patienten erneut eine erfolgreiche konservative Behandlung möglich wäre (*Sackmann et al. 1994*).

1.2 Molekulargenetische Befunde zur Cholelithiasis

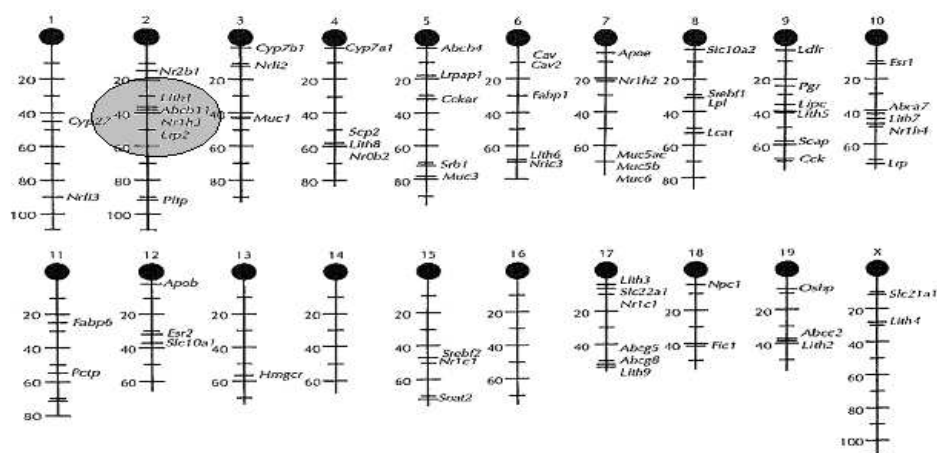
Für hereditäre Faktoren, die zu einer Prädisposition für Gallensteine führen, sprechen die Identifizierung lithogener Gene im Mausmodell und auch verschiedene humangenetische Untersuchungen.

1.2.1 Mausstudien

Für die Ursachenforschung genetischer Erkrankungen werden sogenannte Knockout-Mäuse eingesetzt. Hierbei wurden mittels Manipulation an den Stammzellen gezielt Gene deaktiviert, die dann in die Keimbahn einer Maus eingebracht werden. Mittlerweile gibt es Knockout-

Mäuse für die unterschiedlichsten Forschungsgebiete, so auch in der Gallensteinforschung. So hat bei der Suche nach Gründen für Cholesterinsteine die Nutzung von Inzucht-Mausmodellen zur Identifizierung von 23 Gen-loci geführt, die an der Entstehung von Gallensteinen in der Maus beteiligt sind (so genannte Lith-Gene) (Lyons und Wittenburg 2006). Diese Gene sind mit verstärkter Gallensteinbildung assoziiert, wenn die Mäuse mit spezieller lithogener Nahrung gefüttert werden. Hierin sind verschiedene Anteile an Fetten, Cholesterin und Cholsäure enthalten. Für die Identifikation der Genomregionen wurde die quantitative-trait-locus Analyse (QTL) verwendet. Als Quantitative Trait Locus wird in der Genetik ein Chromosomenabschnitt bezeichnet, für den in entsprechenden Studien ein Einfluss auf die Ausprägung eines Merkmals des Organismus nachgewiesen wurde. In den Gallensteinstudien wurden Kreuzungen aus gallensteinresistenten und gallensteinanfälligen Mäusen genutzt (Paigen *et al.* 2000; Wittenburg *et al.* 2003 a/b; Lyons *et al.* 2003 a/b; Lammert und Sauerbruch 2005). Die humanen Lith-Regionen können nun durch die direkte Homologie zwischen Genregion in der Maus und dem menschlichen Genom identifiziert werden (Wang und Afdhal 2004). Hierdurch hat man eine Anzahl von mehreren Kandidatengenen, die zu weiteren Untersuchungen genutzt werden können. Diese Kandidatengene sind in Abbildung 1 zu sehen, in der ein Überblick über bisher identifizierte Mausloci gegeben ist (Wang und Afdhal 2004). Auf Chromosom 2 der Maus befindet sich die Genregion *Lith 1*. Die hierzu gehörende homologe Region im Menschen wird dort auf ihre Lithogenität untersucht.

Abbildung 1: Kandidatengene im Maussystem



nach Wang und Afdhal 2004

1.2.2 Humane Befunde

Neben den Forschungen am Mausmodell lassen auch Untersuchungen am humanen Genom auf eine genetische Beteiligung der Gallensteinentstehung schließen. Auch zahlreiche Familien- und Zwillingsstudien liefern deutliche Hinweise auf eine polygene Vererbung der Gallensteinerkrankung, wie zum Beispiel das familiär gehäufte Auftreten von Cholesteringallensteinen (*Jackson und Gay 1959; van der Linden und Lindelöf 1965; Durst et al. 1996*) oder eine um etwa den Faktor fünf erhöhte Prävalenz für das Auftreten von Gallensteinen bei erstgradig Verwandten Gallensteinträgern (*Gilat et al. 1983; Jorgensen 1988; Chantret et al. 1988; Sarin et al. 1995*). Epidemiologischen Studien sowie die Familien- und Zwillingsstudien belegen lediglich eine generelle Prädisposition für einen Phänotyp. Assoziationsstudien versuchen hingegen einen direkten Zusammenhang zwischen Gallensteinphänotypen und einzelnen Genen herzustellen.

So haben Rosmorduc et al. Mutationen im humanen *ABCB4*-Gen in Zusammenhang mit frühem Auftreten einer symptomatischen Gallensteinerkrankung gebracht (*Rosmorduc et al. 2003*). Die Forschungsgruppe um Rosmorduc hatte schon 2001 bei Patienten mit Gallenblasensteinen und intrahepatischen Cholesterinsteinen Nonsense- und Missense-Mutationen im *MDR3*-Gen (Gen des kanalikulären Phosphatidycholin-Transporter der Leber; entspricht dem *MDR2* der Maus) identifiziert (*Rosmorduc et al. 2001*). Bei japanischen Patienten mit intrahepatischen Cholesterinsteinen wurde eine verminderte *MDR3*-Expression und bei Patienten mit Mikrolithiasis eine um mehr als die Hälfte verringerte biliäre Phospholipidkonzentration beschrieben (*Shoda et al. 2001; Fracchia et al. 2001*). Pullinger et al. identifizierten eine Deletionsmutation im *CYP7A1*-Gen, das kodierend für die Cholesterol 7 α -Hydroxylase ist. Durch dieses Enzym wird eine wichtige Reaktion im Cholesterinkatabolismus und in der Gallensäuresynthese katalysiert. Bei Ausfall des Enzyms kommt es zu hohen LDL-Werten und zu einer nicht ausreichenden Gallensäurenexkretion. In dieser veränderten Gallenflüssigkeit wird eine Verbindung mit der Entstehung von Gallensteinen vermutet (*Pullinger et al. 2002*).

Eine weitere Studie entdeckte, dass eine Variation im Promoter des *UGT1A1*-Gen (UDP-Glucuronosyltransferase 1A1) bei Patienten mit chronisch, hämolytischen Erkrankungen zu erhöhtem Auftreten von Pigmentgallensteinen führt (*Chaar et al. 2005; Haverfield et al.*

2005). *Wasmuth et al.* brachten die Variation in diesem Gen mit gehäuftem Auftreten von Gallensteinen bei Patienten mit zystischer Fibrose 2006 in Verbindung.

Weitere Assoziationsstudien beschäftigten sich mit den APOE-Polymorphismen (Apolipoprotein E) in Verbindung mit der Entstehung von Gallensteinen, da dieses Protein Liganden für den LDL -Rezeptor der Leber bildet (*Lammert und Sauerbruch 2005*). Hierbei gibt es drei häufige, kodominant vererbte APOE-Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), die typisiert werden können, wobei sechs mögliche Isoformen entstehen (*Fullerton et al. 2000*). Bertomeu et al. zeigten 1996, dass das $\epsilon 4$ -Allel unter anderem mit dem Auftreten von Cholesteringallensteinen assoziiert ist (*Bertomeu et al. 1996*), während das $\epsilon 2$ -Allel einen Schutz vor Gallensteinen zu bieten scheint (*Niemi et al. 1999*). Einer finnischen Studie zufolge hatten Patienten mit APOE4-Isoformen und Gallensteinen eine schnellere Cholesterinkristallisation und eine größere Zahl von Steinen. Diese wiesen zudem einen höheren Cholesteringehalt auf (*Juvonen et al. 1993*). Weitere Studien konnten allerdings die Verknüpfung der Gallensteinerkrankung und dem Apolipoprotein E nicht erhärten (*Juvonen et al. 1995; Fischer et al. 2001*).

1.3 Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen

Mit der vollständigen Entschlüsselung des humanen Genoms kurz nach der Jahrtausendwende boten sich vielfältige Möglichkeiten, die Entwicklung von Methoden und Konzepten komplexer Erkrankungen auf genetische Ursachen voranzutreiben. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über vorhandene Wege bieten und die in dieser Arbeit verwendeten Methoden geben.

1.3.1 Komplexe Erkrankungen

Die Aussage, dass das menschliche Genom entschlüsselt ist, ist so nicht ganz richtig. So ist die gegenwärtig vorhandene Basensequenz teilweise noch unvollständig und mit Fehlern behaftet, so dass allgemein von einem Arbeitsentwurf gesprochen wird.

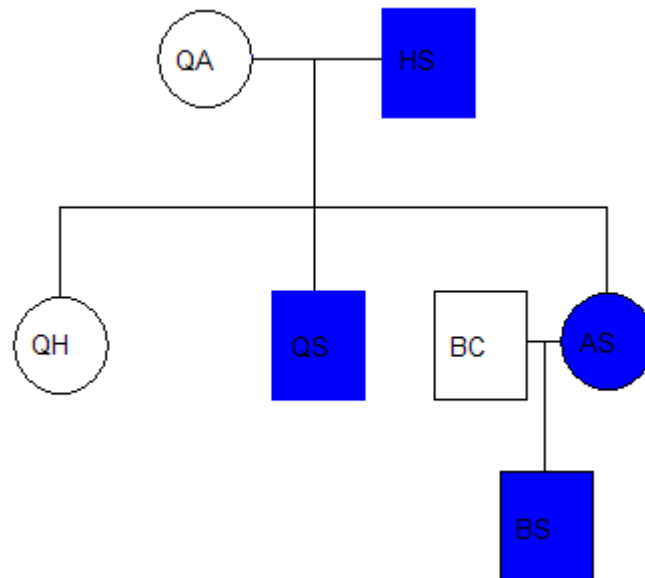
Außerdem handelt es sich nicht um die Sequenz des menschlichen Genoms, sondern bietet sich innerhalb des menschlichen Genoms eine große Variabilität. Diese genetische Variabilität ist bedeutsam, wenn es um die Aufklärung der Ätiologie einer genetischen Krankheit geht (*Ziegler2002*).

Bei Erkrankungen, bei denen eine genetische Komponente vermutet wird, kann man grundsätzlich zwischen mendelschen Erkrankungen und komplexen genetischen Erkrankungen unterscheiden. Bei monogenen (mendelschen) Erkrankungen gibt es einen klaren Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp. Beispiele hierfür wären die zystische Fibrose und die Neurofibromatose.

Bei komplexen Erkrankungen ist der Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp hingegen nicht so eindeutig, da es sich hierbei um polygene Vererbungsmuster handelt. Hier ist nicht nur ein einziges Gen für die Expression einer Krankheit verantwortlich, sondern das Zusammenspiel mehrerer Gene, die noch durch die Umwelt beeinflusst werden können (Ziegler 2002). Monogene Erkrankungen treten insgesamt relativ selten auf, häufiger sind Erkrankungen, die einem komplexen Erbgang folgen, auch Volkskrankheiten genannt. Hierzu zählen unter anderem Asthma (Wjst 2001), Morbus Alzheimer (Corder et al. 1993, Roses et al. 1997, Saunders et al. 1993), Morbus Crohn (Hampe et al. 2001, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001) und Diabetes mellitus Typ 2 (Horikawa et al. 2000).

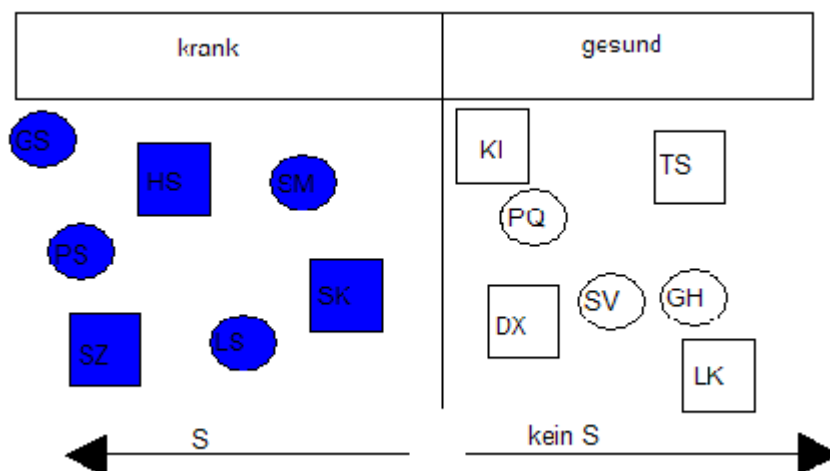
1.3.2 Kopplung und Assoziation

Zunächst muss die chromosomale Region, die für die Krankheitsverursachung verantwortlich ist, identifiziert und lokalisiert werden, damit ein krankheitsassoziiierendes Gen entdeckt werden kann. Hierbei kann bei monogenen Erkrankungen die Methode der familienbasierten Kopplungsanalyse genutzt werden. Dazu prüft man auf das Vorhandensein einer gemeinsamen Vererbung von Krankheitsmerkmalen und genetischen Markern (Ott 1974). Dieses kann man nutzen, da eine bestimmte DNA-Sequenz und ein Marker bei der meiotischen Zellteilung mit einer umso geringeren Wahrscheinlichkeit getrennt werden, umso näher sie beieinander liegen. Die Kopplungsanalyse nutzt hierbei für die Ortsfindung der Krankheitsmerkmale allerdings nur eine Generation, was dieses Verfahren zur Identifizierung der gesuchten Gene komplexer Erkrankungen sehr zeit- und kostenintensiv macht (Ziegler 2002) (Abb.2).

Abbildung 2: Genetische Kopplung

Genetische Kopplung: innerhalb einer Familie wird eine autosomal dominante Erkrankung (blau) immer mit dem Allel S weitergegeben.

Komplexe Erkrankungen können aber nicht nur durch Kopplungsstudien entschlüsselt werden. Eine andere Möglichkeit bieten Assoziationsstudien: Hierbei sucht man sich ein Risikoallel (Abb. 3: „S“), welches man dann auf seine Häufigkeit in Patienten und Kontrollgruppe vergleichen kann.

Abbildung 3: Genetische Assoziation

Genetische Assoziation: Das krankheitsverursachende Allel S ist häufiger bei dem erkrankten Kollektiv zu finden, als beim Gesunden.

Diese Kontrollgruppe kann entweder eine zusätzliche Personengruppe sein (Fall-Kontrollstudie) oder bei familienbasierten Analysen aus nicht vererbten Allelen gebildet werden. Wenn dann nachgewiesen werden kann, dass ein Allel häufiger in einer Patienten- als in einer Kontrollgruppe vorkommt, handelt es sich um genetische Assoziation der Erkrankung mit diesem Allel. Entscheidend für die Entdeckung einer genetischen Assoziation ist, dass das betrachtete Allel selbst kausal für ein Erkrankungsrisiko verantwortlich ist, oder aber mit einem solchen Allel im Kopplungsungleichgewicht steht.

1.3.3 Fall-Kontroll-Studie

Eine Möglichkeit auf eine Verbindung zwischen Kandidatengenen und einer Erkrankung zu untersuchen bietet die Fall–Kontroll-Studie. Hierbei handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung einer Stichprobe, die erkrankte Personen (Fall) und eine Stichprobe aus gesunden Personen (Kontrolle) miteinander vergleicht.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgt mit Hilfe von Vierfeldertafeln. Dabei handelt es sich um eine Anordnung absoluter Häufigkeiten zweier binärer Merkmale. Ein binäres Merkmal ist eine Variable mit nur zwei möglichen Ausprägungen (z.B. Diagnose positiv/negativ; Behandlung ja/nein) (*Bender und Lange 2001*) (Abb.4).

Abbildung 4: Vierfeldertafel

		Fall	Kontrolle	Summe
Gruppe	Exposition	A	B	A+B
	keine Exposition	C	D	C+D
Summe		A+C	B+D	

Um einen Vergleich zwischen zwei Gruppen bezüglich einer Erkrankung herzustellen, lassen sich aus den Zahlen die Effektmaße Odds und Odds Ratio berechnen. Bei den Odds (Chance) handelt es sich um das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis eintritt, zur Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis nicht eintritt ($\text{Odds (P)} = P/(1-P)$). Bei einer Wahrscheinlichkeit von $P = 2/3$ ergibt sich eine Odds (P) $= (2/3) / (1-2/3) = (2/3) / (1/3) = 2:1$

Für exponierte Personen ergibt sich eine Chance von A/B zu erkranken, für die nicht-exponierten berechnet man die Chance aus C/D.

Zu einer gegebenen Chance kann man die zugehörige Wahrscheinlichkeit berechnen durch $p = \text{odds} / (1 + \text{odds})$. So kann man die Eintrittshäufigkeit wahlweise als Wahrscheinlichkeit oder auch als Chance darstellen. Beide Formen sind mathematisch äquivalent und ineinander umrechenbar.

Um jetzt zwei Gruppen miteinander vergleichen zu können, muss man die Odds Ratio (OR) (Chancenverhältnis) hinzuziehen. Hierzu muss man das Relative Risiko (RR) ermitteln: Ist zum Beispiel das Risiko der Kontrollgruppe q und das Risiko der Fallgruppe p, so ist das Relative Risiko der Kontrolle im Vergleich zum Fall gegeben durch $RR = q/p$.

Hieraus ergibt sich für das Odds Ratio (OR) = $(A/B) / (C/D)$ oder $(A \times D) / (B \times C)$. Eine OR von 1 bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den Odds besteht. Das bedeutet, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit der untersuchten Gruppen gleich häufig ist. Somit besteht keine Beziehung zwischen den Variablen. Wird eine OR von kleiner 1 berechnet ist die Chance zu erkranken für exponierte Personen geringer als für nicht exponierte Personen. Ist die OR größer 1 steigt die Chance einer Erkrankung der exponierten Gruppe um den Faktor größer 1 an (*Bender und Lange 2001*).

Durch statistische Tests lässt sich die Aussage, ob eine Exposition eine Krankheit beeinflusst untermauern. Anwendbar für die Vierfeldertafel der χ^2 -Test (Chiquadrat-Test). Hiermit wird die Unabhängigkeit zweier Merkmale getestet. Der Test stellt die Nullhypothese auf, dass alle Variablen unabhängig voneinander in der Grundgesamtheit vorhanden sind oder dass kein Zusammenhang zwischen den variablen besteht. Bei Unabhängigkeit der Krankheit von der Exposition wäre zu erwarten, dass die Verteilung der Exponierten und Nicht -Exponierten bei Fällen und Kontrollen gleich sind. Nun kann getestet werden, ob statistisch signifikante Abweichungen ($p < 0,05$) von der unabhängigen Verteilung vorhanden sind und somit die Erkrankung bei Exposition signifikant häufiger auftritt (*Mitemeyer 2001*).

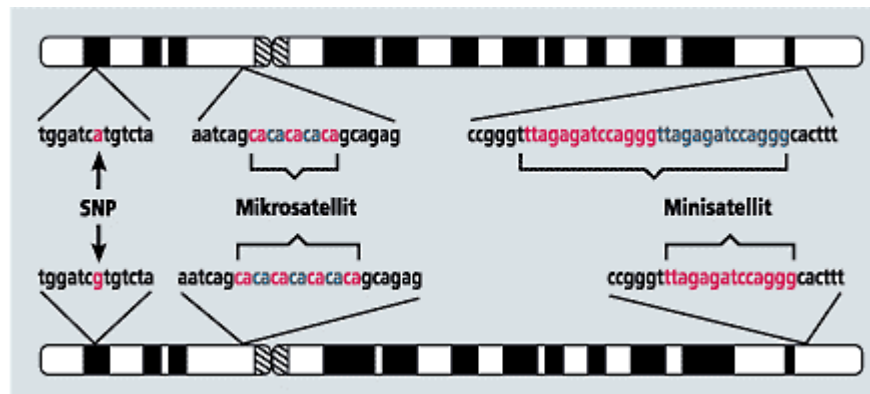
1.3.4 Positionsklonierung und Positionskandidaten

Als nächster Schritt muss nun die tatsächliche Identifikation des Krankheitsgens erfolgen. Dafür kommen zwei Möglichkeiten der Herangehensweise infrage: Bei der ersten Methode wird das relevante Gen nur aufgrund seiner ungefähren chromosomalen Lage durch Sequenzierung oder Nutzen von Sequenzinformationen identifiziert. Die zweite Methode beschreibt in der relevanten chromosomalen Region Positionskandidaten (Kandidatengene),

für die aufgrund einer Kombination von Lokalisation, Expression, Funktion und/oder Homologie ein Zusammenhang mit der Pathogenese einer Krankheit vermutet wird (Ziegler 2002). Die in der vorliegenden Arbeit geprüften Gene (*ABCB11* und *LXRA*) sind funktionelle Kandidatengene.

1.3.5 Genetische Marker

Noch bis Mitte der 1970er Jahre ist die genetische Variabilität auf DNA-Ebene größtenteils unbekannt gewesen oder war technisch nicht nachweisbar. Es stand nur eine kleine Zahl (ca. 100) von Markern für genetische Untersuchungen zur Verfügung, mit denen sich individuelle Unterscheidbarkeit von Genomabschnitten aufdecken ließ. Hierzu gehörten unter anderem das Blutgruppensystem, HLA-Typen und eine kleine Zahl elektrophoretisch nachweisbare Proteinpolymorphismen. Danach wurde die erste Generation genetischer Marker beschrieben, die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs). Mitte der 1980er Jahre kamen die Mini- (VNTRs–variable number of tandem repeats) sowie die Mikrosatelliten (STR–short tandem repeats) hinzu. Dabei handelt es sich um wiederholende Sequenzen in nichtkodierenden DNA-Bereichen. Sie bilden einen Teil der Klasse der repetitiven DNA-Sequenz und machen mehr als die Hälfte des Genoms aus. Sie haben eine große interindividuelle Variabilität, so sind bis zu 80% der Menschen einer Population heterozygot. Von Nachteil für eine systematische Untersuchung der Minisatelliten ist die ungleichmäßige Verteilung, und dass die größte Dichte an den Enden der Chromosomen besteht. Die Mikrosatelliten sind hingegen gleichmäßig über die Chromosomen verteilt und lassen sich experimentell einfacher darstellen (Cichon 2002). Seit Ende der 1990er Jahre werden vermehrt Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs –single nucleotide polymorphisms) verwendet, sie liegen ebenso wie die RFLPs in kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten der DNA und sind Mutationen einzelner Basenpaare. SNPs sind der häufigste Typ genetischer Variationen beim Menschen und machen ca. 90% der interindividuellen Variabilität aus (Collins *et al.* 1998). Eine umfassende Kenntnis der Anzahl der SNPs, ihre Verteilung in einzelnen Bereichen des Genoms, sowie in unterschiedlichen Bevölkerungen gilt als der Schlüssel zum Verständnis von Volkskrankheiten. Allerdings ist für eine sinnvolle genetische Fragestellung eine Allelfrequenz, also die relative Häufigkeit der Kopien eines Allels in der Bevölkerung, von etwa einem Prozent vonnöten. Für diese so genannte *minore Allelfrequenz* schätzt man, dass es etwa 11 Millionen SNPs gibt (Cichon 2002).

Abbildung 5: Genetische Marker

Cichon 2002

1.3.5.1 Blockstruktur des menschlichen Genoms (Haplotyp-Blockstruktur)

Wie in Abschnitt 1.3.5 erwähnt ist die Variabilität des Genoms ganz entscheidend durch die Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) geprägt. Da es mehrere Millionen SNPs gibt, aber nur ein kleiner Teil an der Entstehung von Krankheiten beteiligt ist, suchte man nach Lösungen, nicht alle SNPs auf Krankheitsbeteiligungen untersuchen zu müssen, was technisch und ökonomisch schwierig und zeitaufwendig gewesen wäre. Man entdeckte dann die sogenannte Haplotyp -Blockstruktur des menschlichen Genoms. Hierbei kommen im humanen Genom Regionen mit einem großen Kopplungsungleichgewicht vor. Einzelne Allele können von Genen abhängig auftreten, wenn diese Gene in enger räumlicher Nähe auf einem Chromosom beieinander liegen. Es treten zwei Sequenzvarianten überzufällig häufig zusammen auf, so dass man über die Existenz eines Kopplungsungleichgewichts schließen kann, dass das Wissen über die erste Variante mit erheblicher Wahrscheinlichkeit auch eine zweite Variante besteht. Dieses kann man zur Suche nach Krankheitsgenen ausnutzen. Hierbei wird die experimentelle Untersuchung der bei einem bestimmten Individuum vorliegenden Variante auf einige wenige Varianten beschränkt. Die übrigen lassen sich dann aus den Ergebnissen herauslesen. Das Organisationsmerkmal der Blockstruktur besteht daraus, dass durch ein weit ausgedehntes Kopplungsungleichgewicht gekennzeichnete Blöcke im Wechsel mit Regionen auftreten, in denen fast kein Kopplungsungleichgewicht nachweisbar ist. Die Regionen mit geringem Kopplungsungleichgewicht sind die Regionen, in denen nahezu alle Rekombinationsereignisse der Populationsgeschichte stattfanden. In den dazwischen liegenden Blöcken fanden hingegen nahezu keine Rekombinationen statt. Die Zahl der Allelkombinationen ist durch die Abhängigkeit der Allele verschiedener Polymorphismen in diesen Blöcken stark eingeschränkt. Die beobachteten Kombinationen werden als Haplotypen

bezeichnet. Diese häufigen Haplotypen können meistens durch eine geringe Zahl von Varianten unterschieden werden, was die Anzahl von Polymorphismen, die den Haplotyp-Block kennzeichnen deutlich vermindert (*Freudenberg 2002*).

1.3.5.2 Internationales HapMap Projekt

Um eine vollständige Kartierung der Haplotypen des menschlichen Genoms zu erreichen, wurde 2002 das internationale HapMap Projekt gegründet (www.hapmap.org). Dort haben es sich zehn Zentren in Kanada, China, Japan, Großbritannien, Nigeria und den USA zur Aufgabe gemacht, Gemeinsamkeiten und Unterschiede des menschlichen Genoms zu entdecken und zu katalogisieren. Die gesamte Information soll der Öffentlichkeit frei zugänglich sein. Das Ziel des Internationalen HapMap Projektes ist, die genetischen Sequenzen von verschiedenen Individuen zu vergleichen, um die chromosomalen Regionen mit den genetischen Varianten zu identifizieren. Hier soll beschrieben werden, um welche Varianten es sich handelt, an welcher Stelle in der DNA sie auftreten und wie sie innerhalb einzelner Populationen und weltweit verteilt sind. Hierbei soll im HapMap Projekt kein Zusammenhang zwischen Krankheiten und genetischer Varianten aufgebaut werden, es soll vielmehr als Informationsquelle für Forscher dienen. In der Anfangsphase des Projektes wurden genetische Daten von vier Populationen mit afrikanischer, asiatischer und europäischer Herkunft gesammelt. Hierzu wurde das Genom von 270 Menschen durchforstet, die aus den USA/Europa, Afrika, Japan und China stammten. Diese Erbgutproben gelten als repräsentativ für die Weltbevölkerung. Für die vorliegende Studie wurden Daten von Proben für die SNP-Selektion verwendet, die das Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH oder CEU) 1980 von US-Amerikanern mit nord- und westeuropäischen Vorfahren in Utah sammelte.

1.4 Die Kandidatengene *ABCB11* und *LXRA*

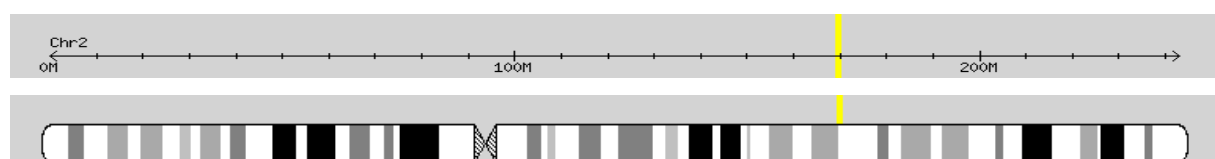
Durch die Grundlagenforschung an Inzuchtmausstämmen konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz dieser Stämme, wenn diese durch eine cholesterinhaltige Diät gefüttert werden, Cholesteringallensteine zu entwickeln differiert. So hatten einige Stämme eine hohe oder mittlere Prävalenz Cholesteringallensteine zu entwickeln, während andere Stämme keine Gallensteine entwickelten, nachdem sie für 18 Wochen die Diät erhielten. Durch Rückkreuzungen wurde die Empfindlichkeit einer Gallensteinformation gefunden, die durch

zwei Gene exprimiert werden. Ein Hauptgen ist das *Lith1*-Gen, welches erstmals 1995 beschrieben wurde. Es liegt auf dem Mausechromosom 2. Nach sechswöchiger lithogener Diät wurde in den Stämmen mit geringer oder keiner Prävalenz für Gallensteine die Aktivität der hepatischen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase herunterreguliert, jedoch nicht in den Stämmen mit hoher Prävalenz. Dies deutet an, dass die Regulation des limitierenden Enzyms der Cholesterinbiosynthese ein entscheidender Faktor ist, warum es zur Cholesterolhypersekretion und darausfolgend zur Lithogenität der Gallenflüssigkeit kommt (*Khanuja et al 1995*). Der *Lith1*-Locus beherbergt zwei funktionelle Kandidatengene, *ABCB11* und *LXRA*, die in der vorliegenden Arbeit auf ihre Lithogenität beim Menschen überprüft wurden. Diese Gene sind zum einen für den Gallensalzexport und zum anderen als Regulator für Cholesterol und Galletransport und –Stoffwechsel mitverantwortlich. In weiteren Studien, unter anderem von *Lammert et al. 2002*, *Paigen et al. 2000* und *Wittenburg et al. 2003*, wurden weitere Gen-loci gefunden, die an der Entstehung von Gallensteinen in der Maus beteiligt sind (sogenannte *Lith* -Gene).

1.4.1 *ABCB11*

Das in der *Lith1*-Region liegende *ABCB11*-Gen (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11) ist kodierend für die Gallensalz-Export-Pumpe (BSEP- bile salt export pump) und liegt beim Menschen auf Chromosom 2q24, welches dem Mausechromosom 2C2 entspricht. Es ist ein erhaltener Teil der MDR (multi -drug resistance) Genfamilie des ATP -binding cassette Transporters. *ABCB11* hat eine große Übereinstimmung mit *MDR1*. Allerdings zeigt es, verglichen mit *MDR1*, keine breite Substratspezifität und erkennt hauptsächlich Gallensäuren (*Noe 2001 und 2002*). Es wird nur in den kanalikulären Membranen von Hepatozyten exprimiert und scheint Prädominant für das Gallensäureabfluss-System der Hepatozyten zu sein (*Kullak-Ublick, Stieger, Meier 2004*). Insgesamt scheinen Mutationen in *ABCB11* mit familiärer intrahepatischer Cholestase assoziiert zu sein (*Strautnieks et al. 1998; Jansen et al. 1999; Goto et al. 2003; Noe et al. 2005*).

Abbildung 6: Chromosom 2



Lage des *ABCB11* Gens auf Chromosom 2 (nach www.hapmap.org)

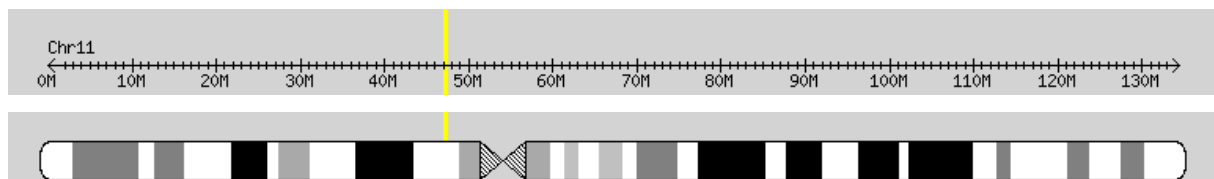
1.4.2 *LXRA*

Der Leber-X-Rezeptor Alpha (*LXRA*) ist beim Menschen auf Chromosom 11p11.2 zu finden und ist homolog zum Maus *Lith1*-Locus auf Chromosom 2E1.

Der Leber-X-Rezeptor (*LXR*) ist ein pleiotropes, d.h. an vielen Orten wirksames, Mitglied der Kernrezeptor-Familie für Transkriptions-Faktoren. Leber-X-Rezeptoren sind u. a. wichtig bei der Regulation des Cholesterol- (*Li und Glass 2004*), Galletransport und -Stoffwechsels (*Makishima 2005*). Im Besonderen werden mehrere ABC Transporter durch dieses Gen reguliert, wie ABCG1 (*Sabol et al. 2005*) und ABCD2 (*Weinhofer et al. 2005*).

Es wurden zwei Isoformen des Leber-X-Rezeptors entdeckt. Während die Ausprägung des Leber-X-Rezeptor Alpha (*LXR α*) auf Leber, Niere, Darm, Fettgewebe, Makrophagen, Lunge und Milz begrenzt ist (*Apfel et al. 1994; Willy et al. 1995*), ist der Leber –X -Rezeptor Beta (*LXR β*) in fast allen Geweben und Organen zu finden (*Shinar et al. 1994*). Die höchste Dichte ist allerdings in der Leber zu finden, wodurch der Rezeptor seinen Namen hat.

Abbildung 7: Chromosom 11



Lage des *LXRA*-Gens auf Chromosom 11 (nach www.hapmap.org)

1.5 Zielsetzung

In dieser Studie soll der Zusammenhang der beiden funktionellen Kandidatengene *ABCB11* und *LXRA* des murinen Genorts *Lith1* mit dem symptomatischen Gallensteinleiden in einer großen Gruppe von cholezystekomierten Patienten und entsprechender gesunder Kontrollgruppe im Rahmen einer Assoziationsstudie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden Patienten des nördlichen Schleswig -Holstein rekrutiert, bei denen zwischen 2001 und 2005 eine Cholezystektomie bei Cholelithiasis durchgeführt wurde. Diese wurden in den chirurgischen Abteilungen der Kliniken Kiel (Universitätsklinik und Städtisches Klinikum), Eckernförde, Husum, Rendsburg (Kreiskrankenhäuser), Flensburg (Diakonie-, Malteserkrankenhaus), Lüneburg (Städtisches Klinikum), Heide (Westküstenklinikum) und Niebüll (Klinikum Nordfriesland) operiert. Die Kontrollgruppe beinhaltete Probanden, die über die 1. Medizinische Klinik rekrutiert wurden und bei denen sonographisch eine Cholelithiasis ausgeschlossen wurde.

2.1.1 Einschlusskriterien

Es wurden Patienten herangezogen, die sich aufgrund einer symptomatischen Cholelithiasis einer Cholezystektomie unterzogen haben. Diese waren bei Diagnosestellung mindestens 18 Jahre alt und hatten das 65. Lebensjahr noch nicht überschritten. Zusätzlich sollten die Patienten der kaukasischen Ethnizität zugehörig sein und aus dem **popgen**-Gebiet (siehe unten) bzw. aus dem Vergleichsgebiet Lüneburg stammen. Zum Ausschluss aus der Studie führte eine andere schwerwiegende Erkrankung.

2.1.2 Rekrutierungsplattform **popgen**

Bei der Forschungsstudie **popgen** handelt es sich um ein populationsgenetisches Forschungsprojekt des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN).

Popgen befasst sich mit der Aufgabe, die Bedeutung genetischer Prädispositionen verschiedener Erkrankungen auf Bevölkerungsebene zu prüfen. Hierbei werden, neben der Gallensteinerkrankung, Krankheiten aus verschiedenen medizinischen Bereichen, wie unter anderem die Epilepsie, essentieller Tremor, koronare Herzerkrankung und das kolorektale

Karzinom untersucht. Gefördert wird dieses Projekt direkt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes. Es umfasst bioinformatische, epidemiologische, medizinische und auch statistische Bereiche, die sich mit dem Prozess der Patientenidentifikation, der Rekrutierung der Probanden, sowie der Präparation der DNA befassen. Durch die **popgen** Rekrutierungsstruktur kann man ein Patientenkollektiv erstellen, das durch seine Größe und durch seine Zusammensetzung in der Lage ist, die Bevölkerungsstruktur zu repräsentieren. Für das **popgen**-Projekt wurde ein geographisch fast abgeschlossener Raum zum Kerngebiet (**popgen**-Gebiet) der Untersuchungen gemacht. Dieser Raum ist südlich durch den Nord-Ostsee-Kanal (inklusive der Stadt Kiel), nördlich durch die Staatsgrenze zu Dänemark, sowie westlich durch die Nordsee, bzw. östlich durch die Ostsee begrenzt. In diesem Teil Schleswig-Holsteins leben rund eine Million Menschen (Krawczak et al. 2006).

Durch diese Begrenzung ergab sich eine überschaubare Anzahl an medizinischen Einrichtungen. Um einen Großteil der operierten Patienten des **popgen**-Gebietes zu erreichen, wurden Daten der Landesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung Schleswig-Holstein verwendet. Hierzu wurde eine Liste mit den dokumentierten Behandlungsfällen im Rahmen der Qualitätssicherung exemplarisch für 2004 genutzt. Im **popgen**-Gebiet lagen 17 Krankenhäuser, in denen, im Jahre 2004, insgesamt 2396 Patienten cholezystektomiert wurden. An der Studie nahmen 10 dieser 17 Kliniken teil, wobei dort im angegebenen Jahr 2211 Gallenblasenentfernungen durchgeführt wurden (BQS Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung 2004). Somit konnten durch die an der Studie teilnehmenden Kliniken 92,3% der cholezystektomierten Patienten erfasst werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 2: Cholezystektomien im popgen-Gebiet 2004

Krankenhaus • teilnehmend:	Anzahl	der
Ev.-luth. Diakonissenanstalt Flensburg	227	
Malteserkrankenhaus St.Franziskus Hospital Flensburg	240	
Universitätsklinikum S.-H. Campus Kiel	149	
Städtisches Krankenhaus Kiel	496	
Westküstenklinikum Heide Akademisches Lehrkrankenhaus	224	
Kreiskrankenhaus Husum	188	
Kreiskrankenhaus Niebüll	87	
Kreiskrankenhaus Eckernförde- Rendsburg gGmbH	195	
Kreiskrankenhaus Rendsburg- Eckernförde gGmbH	267	
Martin-Luther-Krankenhaus Schleswig gGmbH	138	
Städtisches Klinikum Lüneburg		
Gesamt:	2211	92,3%
• nicht teilnehmend:		
St. Elisabeth- Krankenhaus, Kiel	26	
Klinik Waldwiese GbR	33	
Kreiskrankenhaus Tönning	46	
Margarethen-Klinik Gemeinnützige GmbH	13	
Kreiskrankenhaus Föhr-Amrum	8	
Fehmarnsches Krankenhaus	21	
Asklepios Nordseeklinik GmbH, Sylt	38	
Gesamt:	185	7,7%
Alle:	2396	
Tabelle 3: Behandlungsfälle im Popgen Gebiet 2004		

Ferner wurde ein Patientenkollektiv am Kreiskrankenhaus Lüneburg, Niedersachsen außerhalb des **popgen** -Gebietes als Vergleichsgruppe rekrutiert.

2.1.3 Rekrutierung

Zur Rekrutierung wurde die Infrastruktur, das Datenmanagement und die Datenschutzstruktur des **popgen**-Projektes (Populationsgenetik) genutzt.

Patienten, welche die Anforderungen der Studie erfüllten, wurden von den jeweiligen chirurgischen Kliniken schriftlich kontaktiert und zur Teilnahme an der Studie aufgefordert. Diese konnten dann ihre Bereitswilligung zur Teilnahme an der Studie durch eine Antwortkarte erklären. Patienten, von denen keine Antwort eingegangen war, wurde ein Erinnerungsschreiben zugesandt. War danach noch immer keine Antwort erfolgt, wurden diese Patienten, soweit möglich, telefonisch kontaktiert und in einem persönlichen Gespräch von der Notwendigkeit ihrer Teilnahme unterrichtet. Zur Teilnahme einverständene Patienten, wurden durch die Mitarbeiter des **popgen**-Projektes zentrumsbasiert kontaktiert. Diesen Patienten wurde dann ein Päckchen, welches einen Fragebogen, eine Einwilligungserklärung (siehe Anhang), sowie ein Blutentnahmeset beinhaltete, zugesandt. In dem Fragebogen sollten Angaben über die Herkunft, Gesundheitszustand und die Cholelithiasis beantwortet werden. Dazu wurden Kriterien wie Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung sowie Operation, Körpergröße, Körpergewicht und eventuelle Anzahl der Schwangerschaften abgefragt. Ferner wurde nach Gallensteinerkrankungen von Verwandten gefragt. Das Blutentnahmeset diente zur Gewinnung von 30ml periphervenösem Blut in EDTA-Blutröhrchen, was im Rahmen von Routineuntersuchungen beim Hausarzt durchgeführt wurde. Zusätzlich bestand das Angebot der Blutentnahme durch Studienmitarbeiter des **popgen**-Projektes.

2.1.4 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten Patienten, bei denen im Rahmen einer Ultraschalluntersuchung der Gallenblase und Gallenwege keine Gallensteine nachgewiesen werden konnten. Diese Kontrollpersonen wurden in den Jahren 2003 und 2004 während einer Routineuntersuchung in der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel sonographiert. Nach Einverständnis zur Teilnahme an der Studie wurde auch durch diese Patienten ein Fragebogen (siehe Anhang) ausgefüllt, eine Einverständniserklärung unterschrieben, sowie ihnen 30ml peripher-venöses Blutes entnommen.

2.1.5 Datenschutz und Ethik

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter dem Vorsitz von Prof. Dr. med. Jürgen Schaub überprüfte die eingereichten Unterlagen vom 29.09.2003 des Studienplanes: **popgen**-populationsrepräsentative Stichprobe für die populationsgenetische Exploration im NGFN- Phase 1 (Aktenzeichen: A 156/03) auf berufsethische und berufsrechtliche Bedenken. Die Kommission stimmte am 25.11.2003 darüber überein, dass gegen die Durchführung der Studie keine Bedenken bestehen würden. Auch bestand kein Einwand gegen den Antrag vom 11.05.2004 auf Ausweitung der Studie auf die Untersuchung genetischer Ursachen des Gallensteinleidens.

Das unabhängige Landeszentrum für Datenschutz in Schleswig-Holstein hatte im Hinblick auf das Verfahren und die zu Grunde liegende Einwilligungserklärung in seiner abschließenden Stellungnahme vom 22.09.2003 ebenfalls keine datenschutzrechtlichen Bedenken (AZ: LD1.1-16.01/03.001).

Mit Hilfe der **popgen**-Infrastruktur wurde eine Pseudoanonymisierung durchgeführt. Hierbei bekamen die Fragebögen und Blutproben einen achtstelligen Code, so dass die Patientenidentität nicht mehr ersichtlich war.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 DNA-Extraktion

Mit Hilfe des FlexiGene DNA-Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) konnte die DNA-Extraktion aus 10ml EDTA-Vollblut durchgeführt werden.

Zur Gewinnung von mitochondriale DNA aus Blutleukozyten wurden 25ml des Lysepuffers FG1 zusammen mit den 10 ml EDTA-Vollblut in einem 50ml fassendem Röhrchen gemischt. Hierdurch wurden die Erythrozyten zerstört, während Leukozyten und DNA erhalten blieben. Durch nachfolgende Zentrifugation des Röhrchens für fünf Minuten bei 2000g setzten sich diese am Boden des Röhrchens ab (Pellet). Jetzt wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, so dass dem Pellet 50µl Protease und fünf Milliliter des denaturierenden Puffers FG2 zugesetzt

werden konnte. Dieser Puffer enthielt ein chaotrophes Salz, welches in der Lage war, bestimmte Molekulare Strukturen zu spalten. Dieses Gemisch wurde sofort gevortext, so dass eine homogene Flüssigkeit entstand. Sollten noch Schlieren in der Flüssigkeit sichtbar gewesen sein, wurde noch einmal ein Milliliter des Puffers FG2 hinzu gegeben und danach gevortext. Nun konnte die Probe in einem 65°C warmen Wasserbad für eine Viertelstunde inkubiert werden. Dies war die optimale Temperatur, damit die Protease ihre enzymatischen Prozesse zur Spaltung der zellulären Proteine durchführen konnte. Nach der Inkubation wurde der Suspension fünf Milliliter Isopropylalkohol (Isopropanol) zugegeben. Durch vorsichtiges Mischen der Substanzen fiel nach einigen Substanzen die DNA in Form eines weißen Fadens aus. Nun wurde eine weitere Zentrifugation für drei Minuten bei 2000g durchgeführt, damit sich die DNA am Boden des Röhrchens absetzen konnte. Der Überstand wurde wiederum sorgfältig abgegossen. Nun konnte man 70% Ethanol zugeben, der bewirkte, dass Salze ausgewaschen und die Proteinase entfernt wurde, während die DNA in Fällung blieb. Nach einer letzten Zentrifugation für drei Minuten bei 2000g wurde die DNA mit Hilfe einer Plastikpipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt, wo sie dann einige Minuten trocknen sollte. Als die DNA trocken war, wurde ein Milliliter des Hydrationspuffers (TE -Puffer) hinzu gegeben, so dass sie sich bei einer Inkubation in einem 65°C warmen Wasserbad im letzten Schritt lösen konnte. Um zu überprüfen, ob die Proben einen genügenden DNA-Inhalt hatten, wurde bei diesen eine Gelelektrophorese durchgeführt. Weiterhin wurde die Versuchsreihe mit Hilfe der Picogreen Fluoreszenz (Molecular Probes-Invitogen, Carlsbad, Ca, USA) quantifiziert und auf einen DNA-Inhalt von 20-30ng/µl angeglichen.

2.2.2 Whole genome Amplification (WGA)

Bei der WGA handelt es sich um eine Methode zur gezielten Vermehrung von DNA (Amplifikation), bei der identische Kopien des gesamten vorhandenen Genoms hergestellt werden können. Somit kann auch bei wenig vorhandenem Ausgangsmaterial sichergestellt werden, dass genug DNA für nachfolgende Analysen vorhanden ist. Für die Amplifikation wurde das GenomiPhi Kit von GE Healthcare (München, früher Amersham Bioscience) verwendet. Dazu mischte man zu 1µl DNA 9µl des Sample -Puffers. Darauf folgte die Denaturierung der DNA durch eine dreiminütige Erhitzung auf 95°C. Hiernach wurde die Probe auf Eis gestellt und auf ca. 4°C heruntergekühlt. Im nächsten Schritt wurden dann 1µl der Enzymmischung und 9µl des Reaktionspuffers zusammengefügt. Dieser enthielt die zur

Amplifikation benötigten Desoxyribonucleotide und Salze, mit denen ein optimaler pH-Wert für die nachfolgende enzymatische Reaktion eingestellt werden konnte. Mit Hilfe der Phi29 DNA Polymerase wurde diese Reaktion katalysiert. Nun musste die Probe für 16 bis 18 Stunden bei 30°C inkubiert werden, wobei die DNA-Vermehrung stattfand. Nach der Inkubation wurde die Polymerase- und Exonukleaseaktivität gestoppt. Dieses passierte durch Erhitzung der Probe auf 65°C für 10 Minuten und anschließende Abkühlung wiederum auf 4°C. Nach diesem Schritt konnte die amplifizierte DNA für Experimente genutzt oder für spätere Verwendung bei 4 oder -20°C gelagert werden.

2.2.3 Genotypisierung mit dem SNPlex System

Die Genotypisierung konnte mit Hilfe der SNPlex Reagenzien (Applied Biosystems, Foster City, USA) auf einer robotergesteuerten Plattform durchgeführt werden. Eingesetzt wurden dazu der TECAN Freedom EVO- und der 384well TEMO liquid handling- Roboter (TECAN, Männerdorf, Schweiz). Die SNPlex-Genotypisierung nutzt die Ligation von Oligonukleotiden, wodurch allelische Unterschiede sichtbar gemacht werden können. Zusätzlich kann sie zur gezielten Vermehrung bestimmter Nukleotidsequenzen mit der PCR-Technologie kombiniert werden. So ist eine Genotypisierung von bis zu 48 SNPs in einer Reaktion möglich. Vordergründige Bedeutung bei dieser Methode haben SNP-spezifische Oligonukleotide, welche passend zu den SNPs ausgewählt wurden, die während der **popgen** - Studie markiert werden sollten. Mit Hilfe des HAPMAP- Projektes wurden die entsprechenden SNPs ausgewählt, wobei SNPs der kaukasischen Rasse aus dem CEU-Datenbestand genutzt wurden. Bei den SNP-spezifischen Oligonukleotiden wird für jedes SNP zwischen zwei allelspezifischen Oligonukleotiden (ASOs) und einem Locus-spezifischem Oligonukleotid (LSOs) unterschieden. Die ASOs sind speziell ausgelegt für die Erkennung von Polymorphismen am gewählten 3' Ende des Nukleotids. Die LSO -Sequenz ist identisch mit beiden Allelen eines bestimmten Locus, sowie dessen Nachbarregionen auf der SNP -Seite seiner Ziel -DNA. Die SNPlex Reagenzien beinhalten ASO- und LSO-Linker. Die ASO-Linker haben neben den Bindungsstellen für die Oligonukleotide eine PCR-Primer-Region, sowie eine ZipCode Sequenz. Jede ZipCode Sequenz ist einmalig und komplementär zu einer bestimmten ZipChute-Probe. ZipChute -Probes sind ebenfalls Teil der SNPlex - Reagenzien und haben die Aufgabe, die Ligationsprodukte zu markieren. Dies geschieht, indem sie mit der komplementären ZipCode Sequenz eine Bindung eingehen, die mit Hilfe

einer fluoreszierenden Markierung nachgewiesen werden kann. Zusätzlich verfügt die ZipChute-Probe über eine Struktur, die durch ihre spezifische Größe in der Lage ist, eine Trennung der gebundenen Oligonukleotide mittels Elektrophorese zu ermöglichen. Zur Genotypisierung mussten als erstes die der SNP spezifischen Proben und die Linker durch Phosphorylierung des 5' Endes aktiviert werden. Dies gelang mit Hilfe einer Kinase, die einen Phosphatrest von dATP auf das jeweilige Substrat übertrug. Im nächsten Schritt wurden die fragmentierte gDNA, Ligase und ein Ligationspuffer hinzugegeben. Nun konnte die Ligase die Reaktion katalysieren, in der sich die DNA und die Linker mit den SNP-spezifischen Oligonukleotiden verbunden haben. Bei der anschließenden Purifikation wurden nun ungebundene und auch unvollständig gebundene Anteile der DNA und der Oligonukleotide entfernt. Hierzu musste man Exonuklease I und Exonuklease lambda hinzugeben, welche Nukleinsäuremoleküle spalten können. Damit nicht auch gebundene Substanzen von den Exonukleasen gespalten wurden, sind die Linker mit einem internen Spacer synthetisiert, so dass dort keine Angriffsmöglichkeiten für diese Enzyme bestehen. Als nächstes konnten nun die Ligationsprodukte mit Hilfe der Polymerkettenreaktion amplifiziert werden. Hierzu wurden universelle Primer benutzt, von denen die Vorwärtsprimer (forward primer) ungekennzeichnet und die Rückwärtsprimer (reverse primer) biotiniert vorhanden sind. Nach Beendigung der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf Streptavidin-überzogene Platten aufgebracht. Dabei geht das biotinierte Ende eine irreversible Bindung mit diesem Überzug ein. Durch anschließende Denaturierung und Entfernung des Überstandes blieb nur der biotinierte Strang als Einzelstrang über. Zur Markierung der Ligationsprodukte wurden jetzt die ZipChute-Probes hinzugegeben, welche mit den ZipCode Sequenzen der Einzelstränge hybridisiert wurden. Nun konnten die ZipChute -Probes von den biotinierten Strängen getrennt werden und mit Hilfe des 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) nachgewiesen werden. Die Datenanalyse konnte mit der GeneMapper 4.0 Software von Applied Biosystems erfolgen.

2.2.4 Auswahl der SNPs

Mit Hilfe des Internationalen HapMap-Projekts (www.hapmap.org) konnten die SNPs ausgewählt werden. Hierzu wurden aus dem CEU Datenbestand eine Auswahl von SNPs der kaukasischen Rasse verwendet. Ferner wurden kodierende SNPs, mit einer Häufigkeit größer

als 1% von der dbSNP-Datenbank und von dem Projekt „Pharmacogenetics of Membrane Transporters“ gewählt (<http://pharmacogenetics.ucsf.edu/data.html>).

2.3 Analyse

Die vorliegende Studie ist eine Fall-Kontroll-Studie. Die statistische Analyse der genotypischen und allelischen Einzelpunktassoziationen wurde mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Die Analyse wurde mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Michael Krawczak) durchgeführt. Die Analyse der Haplotypassoziation erfolgte durch das Cocaphase-Programm (<http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/~fdudbrid/software/unphased/>) (*Dudbridge 2003*).

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Es wurden insgesamt 9991 Patienten, die sich in den 11 teilnehmenden Krankenhäusern (siehe Abschnitt 2.1.2) einer Gallenblasenentfernung unterziehen mussten, angeschrieben und gebeten, an dieser Studie teilzunehmen. Von diesen knapp 10000 Patienten konnten 2623 zur Teilnahme herangezogen werden, was einer Quote von 26,25% entspricht. Das mittlere Alter dieses Kollektivs beträgt 48 Jahre. 26,7% der Teilnehmer sind männliche Probanden.

Tabelle 3: Überblick über das Teilnehmerkollektiv

Klinik	Ange- schrieben	verzogen, verstorben	Kontakt	Absage	TN Gesamt	TN % Gesamt
Heide	639	150	489	5	253	52
Husum	524	7	517	9	169	33
Schleswig	880	210	670	6	254	38
Kiel	951	132	819	24	413	50
Lüneburg	1709	305	1404	22	559	40
Rendsburg	1007	205	802	8	302	38
Eckernförde	647	91	556	12	237	43
Diako, Flensburg	1247	303	944	20	303	32
Niebüll	534	110	424	2	127	30
Malteser, Flensburg	292	21	271	0	72	27
Städt. Krankenhaus Kiel	1561	14	1547	6	483	31
SUMME:	9991	1548	8443	114	3172	42 %

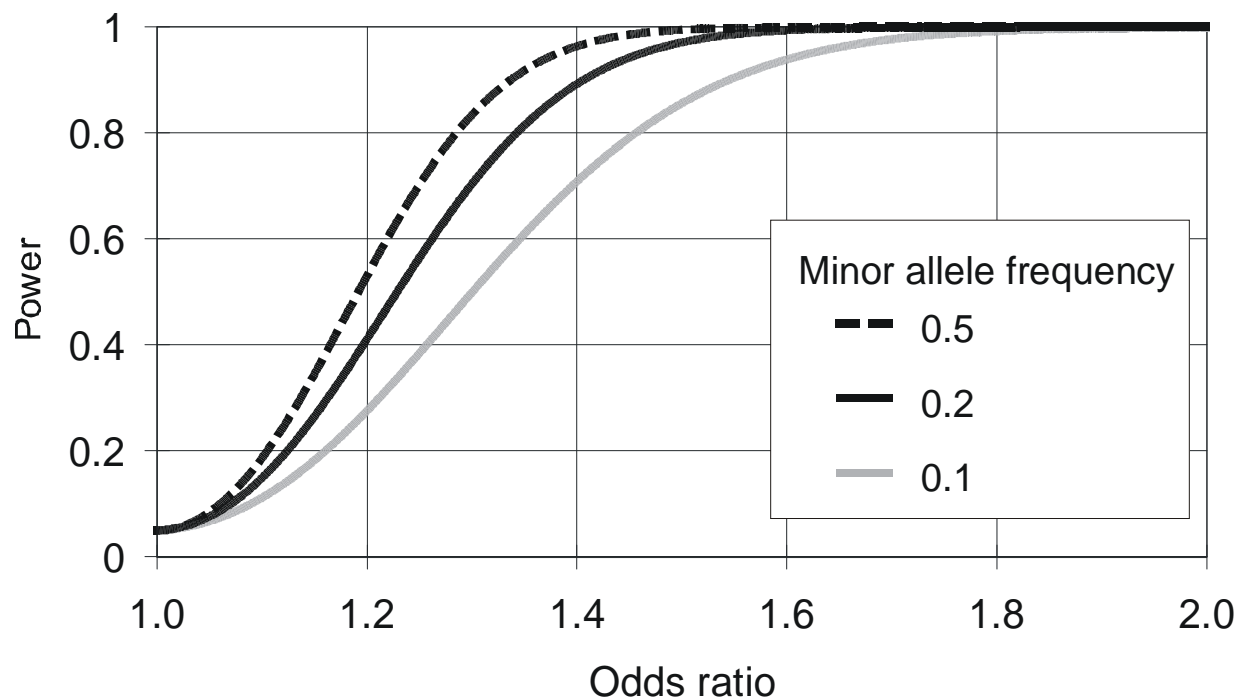
Aus diesem Teilnehmerkollektiv konnten 736 Patienten, die einen mittleren Erkrankungsbeginn von 50 Jahren hatten in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Als Kontrollgruppe wurden 550 Personen hinzugezogen, bei denen man ultraschalldiagnostisch eine Gallenblasenerkrankung ausschließen konnte.

Tabelle 4: Überblick über das Probandenkollektiv

	Anzahl	Ø Alter	Männlich in %
Patienten	736	50	50
Kontrollen	550	63	50

3.2 Studienpower

Um nachweisen zu können, ob mit der Studie überhaupt ein bestimmter, tatsächlich vorhandener Effekt gemessen werden kann, wird die Macht („Power“) einer Studie ermittelt, um die Aussagekraft einschätzen zu können. Hierfür wurde das PS-Power Programm (*Dupont und Plummer 1997*) verwendet. Für die 736 Patienten und 550 Kontrollpersonen wurde diese Berechnung auf allelische Einzelpunkteffekte für ein Signifikanzniveau von 0,05 und einer Odds Ratio zwischen 1 und 2 durchgeführt. Hierbei wurden die drei Allelhäufigkeiten (minor allele frequencies, MAF) 0,1; 0,2 sowie 0,5 einbezogen. Wie Abbildung 8 zeigt, lag die Power, eine Odds Ratio von größer als 1,6 zu erreichen, für alle drei Modelle bei annähernd 80% oder höher. Dies lässt die Aussage zu, dass bei der vorhandenen Kohortengröße ein signifikanter Unterschied bis zu einer Odds Ratio von 1,6 zwischen der Fall und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden kann. Für häufigere Allelfrequenzen (ab 0,5) können auch Odds Ratios von 1,4 mit einer Power von 80% festgestellt werden. Kein Marker zeigte eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p > 0,1$), was ein Zeichen für eine stabile Genotypisierung ist.

Abbildung 8: Studienpower

Die Abbildung 8 zeigt eine graphische Darstellung der geschätzten Power in der ausgewählten Probenzahl für eine Odds Ratio zwischen 1 und 2 auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Der Graph wurde durch das PS – Power-Programm (Dupont und Plummer 1997) generiert und zeigt die Power ($f(x)$) als Funktion der Odds Ratio (x Achse).

3.3 Kandidatengene

Für beide Kandidatengene wurden SNPs (single nucleotide polymorphisms) mit Hilfe der Datenbank des Internationalen HapMap Projektes für die entsprechende Genregion ausgewählt (Altshuler et al. 2005).

3.3.1 ABCB11

Für das *ABCB11*-Gen wurden 29 SNPs ausgewählt. Diese 29 Marker bieten eine gute Abdeckung der genannten Genregion. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Marker über die gesamte Genregion und das dazugehörige Kopplungsungleichgewicht, wie es durch HapMap für Kaukasier (Kategorie CEU) in Haploview (Barrett et al. 2005) erzeugt wurde. Alle kodierenden SNPs, die bei Kaukasiern polymorph für eine Allelfrequenz von 0,01 waren, wurden bei der Genotypisierung berücksichtigt; rs2287622 ist ein gemeinsam kodierender SNP, welcher zu einem Austausch von Alanin zu Valin in Position 444 des Proteins führt. Die Allelfrequenz, die hierfür durch HapMap ermittelt wurde (40,1%) entspricht in etwa den

Frequenzen, die in diesem Experiment für die Patientengruppe (40%) und die Kontrollgruppe (43%) beobachtet wurden. Das relativ selten kodierende SNP rs11568364 wurde ebenfalls untersucht, zeigte allerdings keine Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen Patienten -und Kontrollgruppe (0,02). Die übrigen kodierenden SNPs (unter anderem rs1521808, rs11568364, rs2287617, rs11568357), die durch die HapMap-Datenbank und die angeschlossene Webseite (<http://pharmacogenetics.ucsf.edu/data.html>) ermittelt wurden, waren nicht polymorph für Kaukasier.

Abbildung 9: *ABCB11*-Genstruktur, Lage der ausgewählten SNPs und Kopplungsungleichgewicht

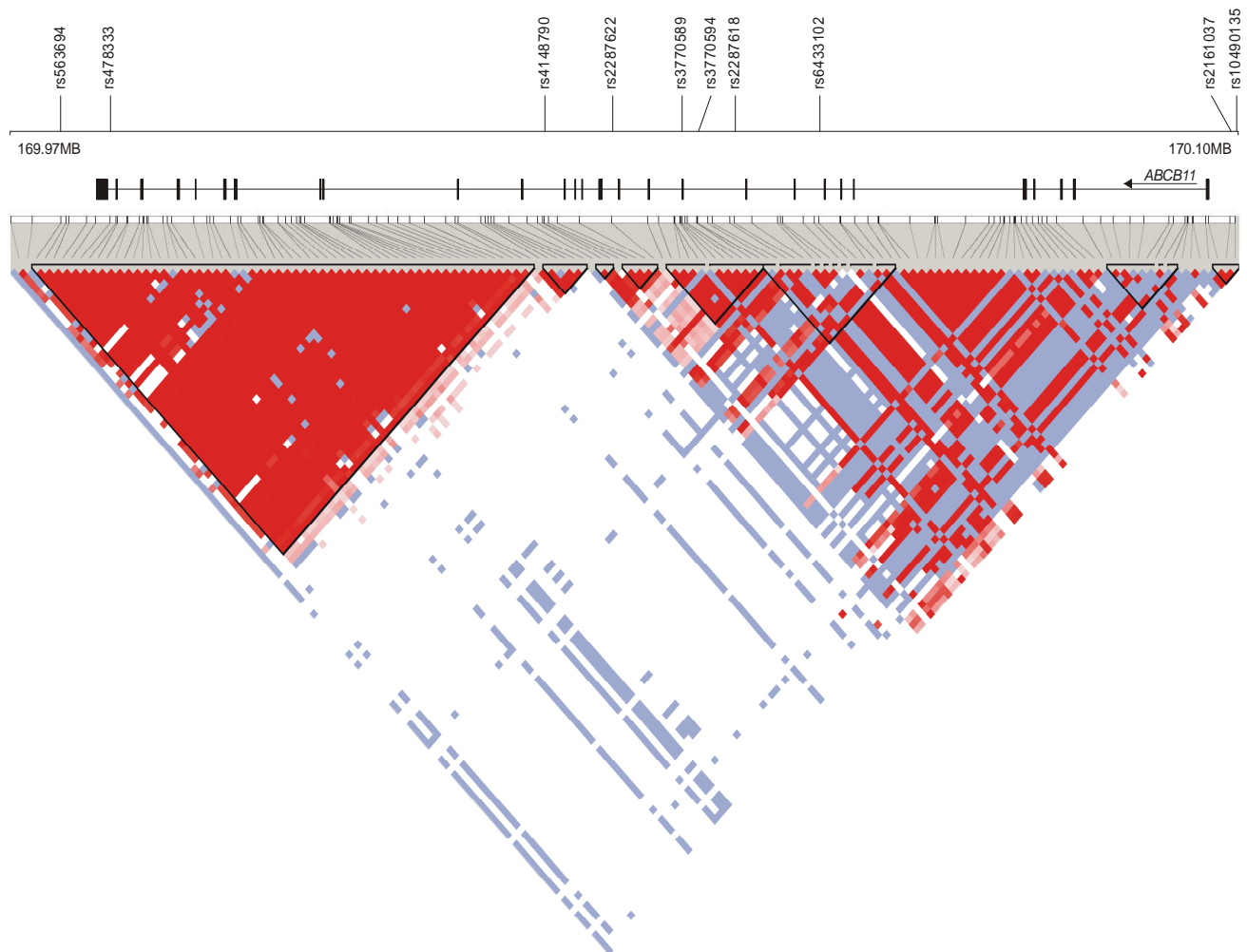


Abbildung 9: Überblick über die physische und genetische Struktur der *ABCB11*-Genregion.

Im oberen Teil der Graphik ist zunächst die Lage der verwendeten SNPs zu sehen, im mittleren Teil eine schematische Zeichnung der Genstruktur. Im unteren Teil der Graphik wird die Struktur des Kopplungsungleichgewichts dieser Genregion gezeigt.

Diese Graphik wurde mit Hilfe des Haploview –Programms (Barrett et al. 2005) aus der HapMap –Datenbank erstellt.

3.3.1.1 Analyse der Einzelpunktassoziationen für *ABCB11*

Die ausgewählten SNPs für die Genregion *ABCB11* wurden in den DNA –Proben der 736 Fälle und der 550 Kontrollen genotypisiert (Tabelle 5).

Bei der Analyse zur Aufdeckung der allelischen Einzelpunktassoziation wurden Signifikanzwerte zwischen $p = 0,11$ und $p = 0,97$ entdeckt (Tabelle 6). Für die genotypische Einzelpunktassoziation lagen die Signifikanzwerte zwischen $p = 0,12$ und $p = 0,92$.

Dies bedeutet, dass sich für die Assoziation zwischen Allelfrequenz der Marker und Zugehörigkeit zur Fall- oder Kontrollgruppe, ebenso wie für die Analyse der genotypischen Einzelpunktassoziationen, keine Signifikanz zeigte. Die statistische Auswertung sowohl der allelischen, als auch der genotypischen Einzelpunktassoziationen wurden mit Hilfe eines Chiquadrat -Tests durchgeführt.

3.3.1.2 Analyse der Haplotypen für *ABCB11*

Um mögliche Gemeinsamkeiten der Haplotypvarianten zu entdecken, die nicht direkt durch einen der 29 SNPs des Experimentes markiert wurden, führte man neben den Einzelpunktanalysen auch Haplotypanalysen durch. Die benachbarten SNPs wurden hierfür zu Haplotypblöcken zusammengefasst. Die Blöcke bestanden aus zwei bis fünf Markern (Tabelle 6). Hierbei ergab sich ein Signifikanzniveau von 0,03 für den Haplotypblock, bestehend aus 4 Markern, der für den Bereich von rs17267869 bis rs2287622 bestand. Allerdings zeigte sich für keinen der benachbarten Haplotypen eine Assoziation. Das häufig kodierende SNP rs2287622 war weder in der Einzelpunktassoziations- noch in der Haplotypanalyse verbunden mit einem erhöhten Gallensteinrisiko.

Tabelle 5: Ergebnisse der Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *ABCB11* –Gen

dbSNP id	Position	MAF case	MAF control	OR _{Rec}	OR _{dom}	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs563694	3' flanking region	0,37	0,33	1,21	1,32	0,13	0,13	0,36	0,46	0,21	0,23
rs478333	3' flanking region	0,48	0,44	1,32	1,25	0,12	0,29	0,25	0,11	0,20	0,23
rs7572878	intron	0,00	0,01	n/a [*]	0,69	0,59	0,59	0,68	0,94	0,50	0,30
rs6709087	intron	0,24	0,22	1,26	1,09	0,44	0,72	0,85	0,96	0,66	0,57
rs4148797	intron	0,30	0,30	1,06	0,96	0,97	0,86	0,93	0,54	0,52	0,08
rs3770582	intron	0,38	0,39	0,97	0,86	0,58	0,37	0,31	0,17	0,20	0,15
rs4148790	intron	0,38	0,41	0,88	0,81	0,32	0,29	0,14	0,08	0,12	0,25
rs17267869	intron	0,16	0,16	0,92	1,04	0,86	0,92	0,79	0,78	0,03	0,23
rs3770585	intron	0,44	0,42	1,22	1,13	0,33	0,61	0,47	0,23	0,41	0,62
rs11568364	coding [met ->val]	0,02	0,02	n/a [*]	0,71	0,35	0,34	0,10	0,38	0,55	0,36
rs2287622	coding [val ->ala]	0,40	0,43	0,78	0,81	0,18	0,34	0,50	0,60	0,50	0,15
rs2058996	intron	0,47	0,47	0,99	0,95	0,94	0,88	0,67	0,62	0,38	0,54
rs3770589	intron	0,48	0,46	1,13	1,05	0,56	0,80	0,50	0,20	0,20	0,52
rs3770594	intron	0,45	0,44	1,12	1,03	0,62	0,83	0,32	0,27	0,80	0,91
rs13416802	intron	0,14	0,12	2,53	1,17	0,20	0,28	0,23	0,42	0,64	0,69
rs7563233	synomous SNP	0,02	0,03	n/a [*]	0,78	0,45	0,44	0,80	0,85	0,88	0,67
rs2287618	intron	0,32	0,33	0,83	0,94	0,47	0,69	0,56	0,85	0,82	0,73
rs6433102	intron	0,25	0,25	0,92	1,05	0,91	0,84	0,81	0,69	0,52	0,50
rs10196426	intron	0,05	0,04	0,56	1,17	0,59	0,71	0,89	0,52	0,61	0,41
rs10209995	intron	0,03	0,02	0,56	1,24	0,57	0,68	0,28	0,26	0,24	0,46
rs3770601	intron	0,10	0,08	4,10	1,29	0,11	0,21	0,23	0,20	0,43	0,44
rs4148772	untranslated	0,03	0,02	n/a [*]	1,29	0,38	0,60	0,28	0,45	0,61	0,54
rs3755161	untranslated	0,03	0,02	0,57	1,30	0,49	0,61	0,85	0,93	0,74	0,70
rs11892966	untranslated	0,05	0,05	0,56	1,05	0,89	0,88	0,96	0,60	0,49	0,62
rs7602171	untranslated	0,34	0,34	0,89	1,00	0,77	0,80	0,53	0,41	0,68	0,58
rs13430236	untranslated	0,48	0,47	1,10	1,16	0,58	0,59	0,38	0,81	0,71	- [#]
rs4233823	5' flanking region	0,06	0,08	n/a [*]	0,74	0,15	0,20	0,53	0,52	- [#]	- [#]
rs2161037	5' flanking region	0,45	0,46	0,91	0,97	0,66	0,87	0,59	- [#]	- [#]	- [#]
rs10490135	5' flanking region	0,45	0,43	1,18	1,15	0,40	0,64	- [#]	- [#]	- [#]	- [#]

^{*} no odds ratio calculated due to low allele frequency, [#] p-value reported for the first marker in the haplotype window

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *ABCB11*-Gen. Hierbei sind die MAF (minor allele frequencies) für Patientengruppe und Kontrollgruppe dargestellt.

Ferner können die Odds Ratio sowohl für einen dominanten (OR_{dom}), wie auch für einen rezessiven Erbgang (OR_{rec}) abgelesen werden. Die p-Werte beziehen sich auf die allelischen und die genotypischen Assoziationsanalysen

HAP2 bis HAP5 stehen für die durchgeführten Haplotypanalysen, die mit Hilfe des Cocaphase-Programms berechnet wurden.

3.3.2 *LXRA*

In gleicher Weise, wie für *ABCB11* beschrieben, wurden auch für das zweite Kandidatengen *LXRA* zehn SNPs ausgewählt. Allerdings existieren für die Genregion *LXRA* keine veröffentlichten kodierenden SNPs, weshalb eine reine Haploty-Markierung vorgenommen wurde. Abbildung 10 zeigt eine Abbildung der Genregion *LXRA*, die Lage der SNPs, sowie einen Überblick über das Kopplungsungleichgewicht.

Abbildung 10: *LXRA*-Genstruktur, Lage der ausgewählten SNPs und Kopplungsungleichgewicht

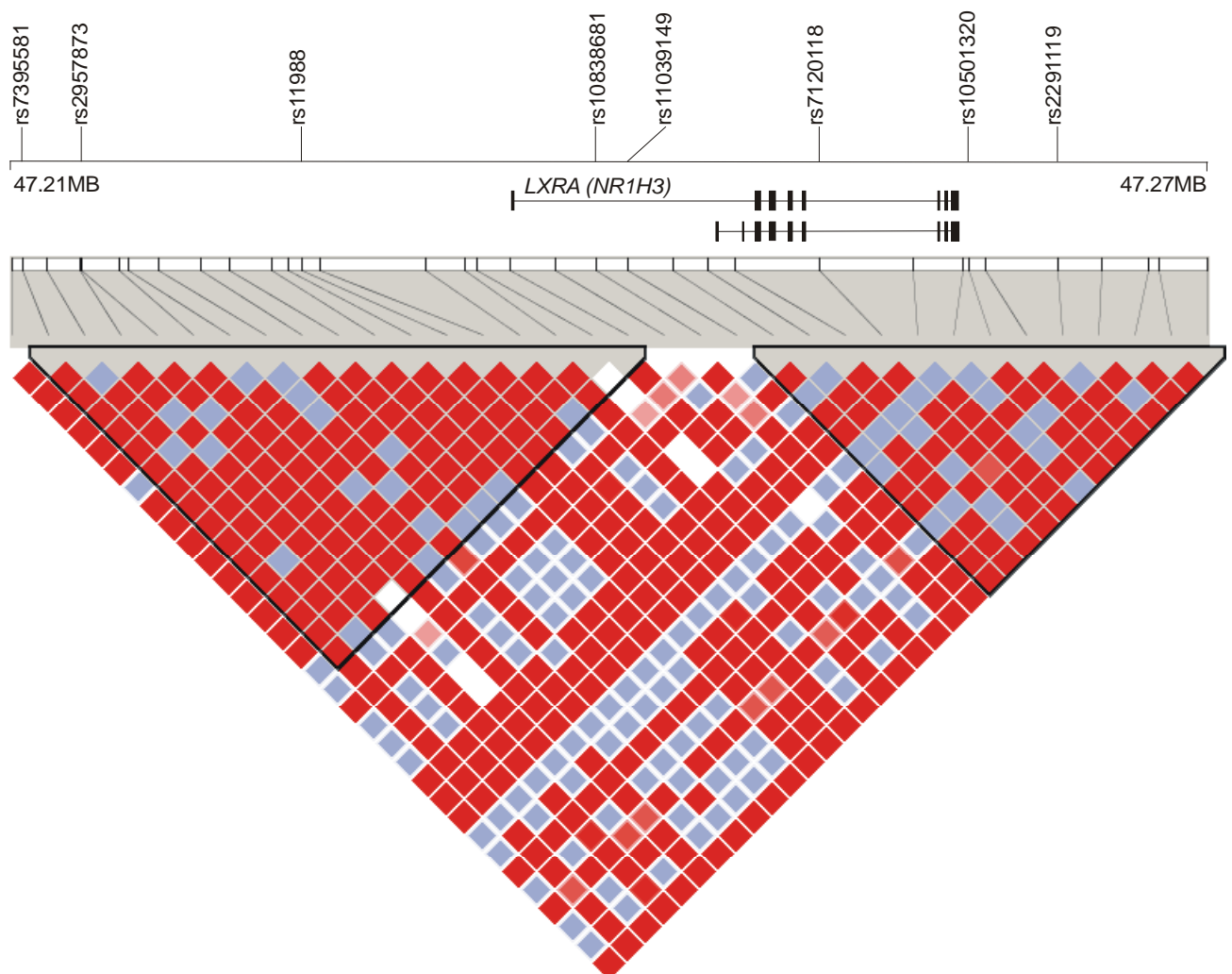


Abbildung 10: Überblick über die physische und genetische Struktur der *LXRA*-Genregion.

Im oberen Teil der Graphik ist zunächst die Lage der verwendeten SNPs zu sehen, im mittleren Teil eine schematische Zeichnung der Genstruktur. Im unteren Teil der Graphik wird die Struktur des Kopplungsungleichgewichts dieser Genregion gezeigt. Diese Graphik wurde mit Hilfe des Haploview-Programms (Barrett et al. 2005) aus der HapMap-Datenbank erstellt

3.3.2.1 Analyse der Einzelpunktassoziationen für *LXRA*

Auch für diese Genregion wurde für die gewählten SNPs eine genetische Analyse der Einzelpunktassoziationen durchgeführt (Tabelle 7). Hierbei ergaben sich für die allelische Einzelpunktassoziationen Signifikanzwerte zwischen $p = 0,28$ und $p = 0,75$.

Für die genotypische Einzelpunktassoziationen ergaben sich Signifikanzwerte zwischen $p = 0,32$ und $p = 0,95$. Dies bedeutet, dass die p-Werte sowohl für die allelische, als auch für die genotypische Einzelpunktassoziation nicht im signifikanten Bereich liegen.

3.3.2.2 Analyse der Haplotypen für *LXRA*

Wie auch für das Kandidatengen *ABCB11* wurde für das Kandidatengen *LXRA* Haplotypanalysen durchgeführt. Diese Analysen ergaben p-Werte zwischen $p = 0,166$ und $p = 0,937$. Auch diese Werte hatten somit keine Signifikanz (Tabelle 7).

Tabelle 6: Ergebnisse der Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *LXRA* –Gen

dbSNP id	Position	MAF case	MAF control	OR _{Rec}	OR _{dom}	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs7395581	5' flanking region	0,23	0,24	0,84	0,89	0,37	0,67	0,505	0,641	0,732	0,643
rs2957873	5' flanking region	0,37	0,36	0,82	0,97	0,69	0,82	0,930	0,937	0,808	0,438
rs11988	5' flanking region	0,05	0,05	1,06	1,05	0,75	0,95	0,811	0,715	0,782	0,551
rs11039143	5' flanking region	0,16	0,17	1,02	1,13	0,55	0,68	0,622	0,674	0,466	0,495
rs3758668	5' flanking region	0,29	0,31	0,73	0,97	0,70	0,75	0,781	0,453	0,471	0,386
rs10838681	intron	0,25	0,28	0,78	0,90	0,30	0,56	0,183	0,337	0,273	0,205
rs11039149	intron	0,34	0,35	0,79	0,87	0,28	0,56	0,244	0,206	0,166	- [#]
rs7120118	intron	0,25	0,26	0,87	0,92	0,48	0,79	0,473	0,260	- [#]	- [#]
rs10501320	3' flanking region	0,28	0,27	0,86	0,93	0,52	0,82	0,802	- [#]	- [#]	- [#]
rs2291119	3' flanking region	0,23	0,24	0,87	1,14	0,69	0,32	- [#]	- [#]	- [#]	- [#]

[#] p-value reported for the first marker in the haplotype window

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der markierten SNPs im *LXRA*-Gen. Hierbei sind die MAF (minor allele frequencies) für Patientengruppe und Kontrollgruppe dargestellt.

Ferner können die Odds Ratio sowohl für einen dominanten (OR_{dom}), wie auch für einen rezessiven Erbgang (OR_{rec}) abgelesen werden. Die p-Werte beziehen sich auf die allelischen und die genotypischen Assoziationsanalysen. HAP2 bis HAP5 stehen für die durchgeführten Haplotypanalysen, die mit Hilfe des Cocaphase-Programms berechnet wurden.

4 Diskussion

Es konnten keine signifikanten Ergebnisse für die Untersuchung einer Assoziation von Varianten im Bereich der beiden Kandidatengene *ABCB11* und *LXRA* mit der Gallensteinerkrankung erbracht werden. Weder die Einzelpunktanalysen noch die danach durchgeführten Haplotypanalysen führten zu signifikanten Ergebnissen, obwohl die berechnete Teststärke (Power) eine Odds Ratio von 1,6 zu erreichen bei über 80% lag. Die möglichen Gründe für eine fehlende Signifikanz werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Relevanz der Gallensteinerkrankung

Die Gallensteinerkrankung (Cholelithiasis) ist eine der am häufigsten auftretenden und teuersten gastroenterologischen Krankheiten der westlichen Welt. Diese Erkrankung gehört zur Gruppe der komplexen metabolischen Funktionsstörungen beim Menschen, dessen pathophysiologischer Mechanismus nicht ausreichend aufgeklärt ist (*Lammert und Sauerbruch 2005*).

Die Gallensteinerkrankung belastet in einem großen Maße die Gesundheitssysteme weltweit. 10% der Europäer und Amerikaner sind Gallensteinträger (*Kratzer et al. 1999*). Zudem steigt die Prävalenz der Gallensteinerkrankung mit zunehmender Lebenserwartung (*Paigen und Carey 2002*). Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 170000 Gallenblasenentfernungen, in den USA gar geschätzte 700000 Interventionen durchgeführt (*BQS 2005; Liver Disease Subcommittee 2005*). Dies verursacht alleine in den USA Kosten von über 6,5 Milliarden US\$ jährlich und ist damit die zweitteuerste Verdauungsstörung, nach der gastroösophagealen Refluxerkrankung (*Sandler et al. 2002*). Diese Fallzahlen und die daraus entstehenden Kosten werden sich zukünftig weiter erhöhen, da sich schon jetzt die Prävalenz der Gallensteinerkrankung seit 1973 von 5,5% (*Koutselinis et al. 1975*) auf bis zu 21,2% im Jahr 2005 erhöht hat (*Völzke et al. 2005*). Außerdem kann eine Veränderung in der Gallensteinzusammensetzung beobachtet werden kann (*Schafmayer et al. 2006*), die wohl auch auf veränderte Ernährungs- und Lebensgewohnheiten zurückzuführen sind.

Aber nicht alleine die wirtschaftlichen Folgen der Gallensteinerkrankung sind erwähnenswert, sondern auch die Mortalitätsraten nach Cholezystektomien. Die Gallenblasenentfernung gehört heute zu den Routine-Operationen, die meist laparoskopisch, mit einem relativ

geringen Operationsrisiko durchgeführt werden können. Allerdings erhöht sich das Operationsrisiko bei älteren Personen, oder bei Personen mit akuten Beschwerden, die einer sofortigen chirurgischen Intervention zugeführt werden müssen. Die Mortalitätsrate beträgt zwischen 0,1% in klinischen Studien (*The Southern Surgeons Club 1991*) bis zu 0,8%, dokumentiert für alle Cholezystektomien in Deutschland 2002 (*BQS 2005*). In den Vereinigten Staaten wird über eine Zahl von etwa 3000 Todesfällen jährlich (0,12% aller Todesfälle) berichtet, die durch Komplikationen der Gallensteinerkrankung, wie Cholangitis, Pankreatitis oder Perforation verursacht werden (*Liver Disease Subcommittee 2005*).

Gerade die beobachteten Punkte, wie Anstieg der Prävalenz um mehr als 15% seit Anfang der 1970er Jahre und das, zwar im Vergleich mit anderen Erkrankungen geringe, aber doch existente Operationsrisiko, im speziellen auch älterer, multimorbider Patienten, bei zunehmendem demographischen Wandel hin zu einer älteren Bevölkerung zeigen die Notwendigkeit, diese Erkrankung weiter zu erforschen. Dazu kommen noch die steigenden Kosten für die Gesundheitssysteme weltweit, die schon jetzt teilweise an ihre finanziellen Belastungsgrenzen angelangt sind. Nur durch weitere Forschung an dieser komplexen Erkrankung wird es möglich sein, ihre Pathogenese so zu verstehen, dass dann neue Therapie- oder Präventionsstrategien entwickelt werden können.

4.2 Genetik der Gallensteinerkrankung

Beweisen die bisher durchgeführten Studien hinreichend, dass eine genetische Komponente an der Entstehung der Gallensteinerkrankung mitverantwortlich ist? Der Verdacht, dass bei der Gallensteinerkrankung eine genetische Komponente eine Rolle spielen kann wurde schon am Anfang des 20. Jahrhunderts geäußert. So beschrieben *Huddy et al.* bereits 1925 die familiäre Häufung dieser Krankheit. Jedoch basierte die Diagnose von Gallensteinen dabei rein auf klinischen Symptomen (*Huddy et al 1925*) und es konnten damals, gegenüber seltenen genetischen Erkrankungen, nur relativ wenige positive genetische Marker, für die Anfälligkeit an Gallensteinen zu erkranken, aufgefunden gemacht werden. Weitere Studien, in denen oft nach Indizien auf familiäre Häufung gesucht wurden, bekräftigten die Vermutung einer genetischen Komponente dieser Erkrankung. So wurden in den Studien von *van der Linden (1973)* und *Kratzer et al. (1998)* zusätzlich die Eltern der erkrankten Person auf Gallensteine untersucht. Neben den Familienstudien wurden auch Studien an mono- und dizygoten Zwillingspaaren durchgeführt. Auch hier gab es Hinweise auf eine genetische Komponente der Gallensteinerkrankung. So zeigte sich bei monozygoten Zwillingspaaren ein

häufigeres Auftreten der Gallensteinerkrankung als bei den dizygoten Paaren. Es lagen Gallensteine zwischen 39% und 56% bei beiden monozygoten aber nur zwischen 0% bis zu 8% bei beiden dizygoten Zwillingspaaren vor (*Harvald und Hauge 1956; Doig et al. 1957; Kesäniemi et al. 1989*). Eine schwedische Studie befasste sich ebenfalls mit Gallensteinen bei Zwillingspaaren. In dieser Studie wurden insgesamt 43141 Zwillingspaare aus dem schwedischen Zwillingsregister auf Gallensteine untersucht, wobei man bei insgesamt 2809 Zwillingspaaren Gallensteine finden konnte. Auch dort zeigte sich bei den monozygoten eine höhere Konkordanz gegenüber den dizygoten Zwillingspaaren (10% versus 7%) (*Katsika et al. 2005*). Sowohl diese Studie, als auch die vorher durchgeführten Studien, zeigen, dass die genetische Komponente einen Anteil von bis zu 30% an der Gallensteinerkrankung hat. Es kann also sehr wohl gesagt werden, dass der Gallensteinerkrankung unter anderem eine genetische Ursache zugrunde liegt.

Ein Problem der bisher durchgeführten Studien waren jedoch die zum Teil sehr geringen Fallzahlen, im Hinblick auf das Auftreten der darin untersuchten Erkrankungen in der Bevölkerung. So hatten die frühen Studien von *Huddy et al. (1925)* und *Körner et al. (1937)* Fallzahlen von je 114 Probanden, *van der Linden* hatte (1973) in seiner Studie eine Fallzahl von sogar nur 74 Probanden. Auch bei den frühen Zwillingsstudien lagen die Fallzahlen nur zwischen 35 und 113 Paaren (*Harvald und Hauge 1956; Doig et al. 1957; Kesäniemi et al. 1989*). Diese Fallzahlen sind bei einer Prävalenz in der europäischen Bevölkerung, die altersabhängig zwischen 15% und 40% liegt (*Barbara et al. 1987; Jorgenson 1987; The Rome Group... 1988*) verhältnismäßig gering. Es wurden aber auch Studien veröffentlicht, die deutlich größere Fallzahlen aufwiesen. *Kratzer et al (1998)* rekrutierten für ihre Studie insgesamt 1112 Probanden und *Nürnberg et al. (1989)* sogar 1300 Probanden. Die vorliegende Studie bewegt sich mit einer Gesamtrekrutierungszahl von ca. 3000 Patienten und einer ausgewählten Fallzahl von insgesamt 1286 Probanden für die durchgeführte Untersuchung in ebendiesen Bereichen und stellt somit eine der umfangreichsten Studien zum Thema der genetischen Aufklärung der Gallensteinerkrankung dar. Mit dieser Kohortengröße ist es möglich, in Bezug auf die Prävalenz der Gallensteinerkrankung in der Bevölkerung, signifikante Aussagen zu treffen.

4.3 Die *Lith*-Genregion

Durch Analyse des Mausgenoms und der vorhandenen Homologie zum menschlichen Genom konnten verschiedene Genregionen durch quantitative trait locus (QTL) Kartierung (eine

genetische Technik, die zur Identifikation von Genen zum Einsatz kommt, die komplexe Eigenschaften beherbergt) ausfindig gemacht werden, die angeschuldete werden, Gallensteine auszulösen. Eine prominente Genregion ist dabei die *Lith*-Region, in der auch die beiden hier behandelten Kandidatengene *ABCB11* und *LXRA* zu finden sind. Insgesamt wurden im Mausmodell bis heute 23 verschiedene chromosomale Regionen (*Lith1* – 23) entdeckt, die mit der Entstehung der Gallensteinerkrankung bei der Maus und auch beim Menschen in Verbindung stehen könnten (Lyons und Wittenburg 2003). Die hier untersuchte Genregion *Lith1* auf dem Chromosom 2 der Maus wurde das erste Mal 1995 durch QTL identifiziert. Um diese *Lith*-Gene zu finden wurden spezielle Inzucht-Mausstämme benutzt. Diese Mäuse wurden mit einer labortechnisch hergestellten cholesterinarmen Diät oder mit einer halbsynthetisch hergestellten cholesterinreichen Diät gefüttert. Die cholesterinreiche Diät bestand hierbei aus 15% Fett, 1% Cholesterin, 0,5% Cholsäure, 2% Maisöl, 50% Saccharose, 20% Kasein, sowie essentielle Vitamine und Mineralien. Diese Diät bekamen die Mäuse in einem Alter ab acht Wochen für unterschiedliche Zeiträume. Nach 18 Wochen cholesterinreicher Ernährung wurden die unterschiedlichen Mausstämme dann unter anderem auf das Vorhandensein von Gallensteinen untersucht. Hier zeigten sich dann unterschiedliche Prävalenzen für das Auftreten von Gallensteinen (Khanuja et al. 1995). Obwohl die Homologie des Mausgenoms zum humanen Genom unbestritten ist, konnten die, in den Mausmodellen gefundenen *Lith*-Loci, keinen signifikanten Zusammenhang mit der genetischen Ursache der Gallensteinerkrankung beim Menschen zeigen. Weder die Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *Lith1*-Kandidatengene, noch die Untersuchung der am selben Probandenkollektiv untersuchten murinen *Lith6*-Kandidatengene *APOBEC1* und *PPARG* (Schafmayer et al. 2007), die eine wichtige Rolle im Cholesterolfstoffwechsel einnehmen, konnten Assoziationen mit dem humanen Gallensteinleiden nachweisen. Die Frage, warum die Untersuchungen an den beschriebenen Genarealen der Mausstämme zur Gallensteinbildung führen, während Untersuchungen am menschlichen Genom diesen Zusammenhang nicht belegen konnten, drängt sich nun auf. Dieses kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann es sein, dass die lithogenen Regionen bei der Maus keine Relevanz für die Gallensteinentwicklung beim Menschen haben. Dagegen spricht, dass vor kurzem der hepatische Cholesterolf-Transporter *ABCG8* (*Lith9*) als Suszeptibilitäts-Faktor für das humane Gallensteinleiden identifiziert werden konnte (Buch et al. 2008). Diese Untersuchung erfolgte ebenfalls am selben Probandenkollektiv, wie die Untersuchung der Kandidatengene *Lith1* und *Lith6*. Ein weiterer Ansatz für die fehlende Signifikanz wäre die Betrachtung der Inzucht-Mausstämme. Bei den Inzucht-Mausstämmen

handelt es sich um speziell gezüchtete Tiere, die in dieser Gen-Konstellation in der Natur nicht vorkommen. Ferner werden die Tiere mit einer unnatürlichen Diät gefüttert. Vielleicht lassen sich aus diesen Gründen keine Zusammenhänge mit natürlich selektierten murinen oder auch humanen Populationen herstellen. Dagegen spricht allerdings, dass die Nutzung von Inzucht-Mausstämmen ein anerkanntes Verfahren ist, welches schon viele Erkenntnisse zur Genetik hervorgebracht hat. Ein dritter möglicher Grund für mangelnde Signifikanz kann auch die zu kleine Anzahl untersuchter, in der *Lith1*-Region vorhandener Gene sein. Hier konnten nur zwei Gene untersucht werden, die in Zusammenhang mit dem Gallensteinleiden stehen könnten. Die beiden funktionellen Kandidatengene, sowohl *ABCB11*, als auch *LXRA*, sind zwar auf dem murinen Chromosom 2 zu finden (*ABCB11*: 2C2; *LXRA*: 2E1), auf dem humanen Genom allerdings auf zwei verschiedenen Chromosomen. *ABCB11* ist ebenso auf Chromosom 2 gelegen (2q24), *LXRA* hingegen auf Chromosom 11 (11p11.2).

Abbildung 11: DNA-Region *Lith1* auf Chromosom 2 der Maus

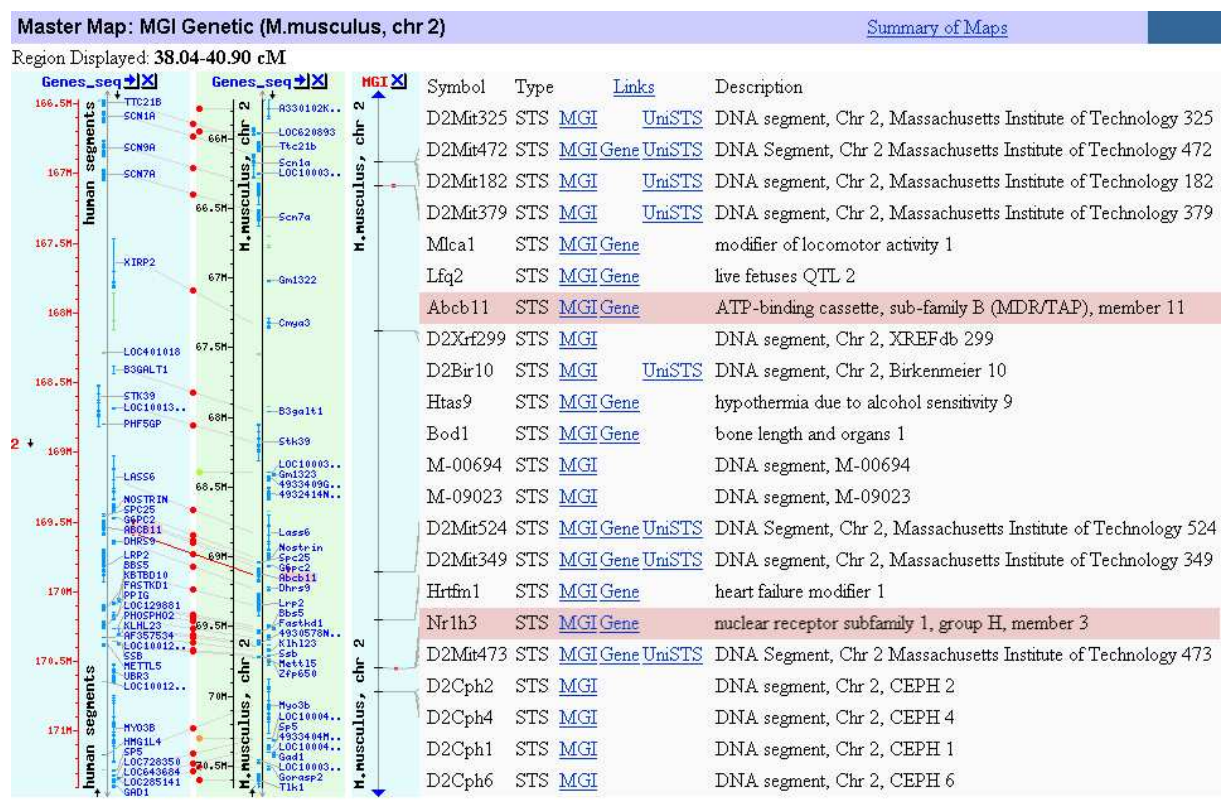


Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Region *Lith1* auf dem Mauschromosom 2 mit den Kandidatengenen *ABCB11* und *LXRA*, sowie deren orthologen Position auf dem humanen Genom (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>)

Es konnte nur ein kleiner Teil der Genregion *Lith1* untersucht werden (siehe Abbildung 11), die sowohl in der Maus, als auch im Menschen eigentlich eine große Anzahl an Gensequenzen beinhaltet. Daher sind eine weitergehende Feinuntersuchung der Maus-Loci und eine Identifizierung der verursachenden Varianten im Tiersystem nötig, um diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen zu können.

4.4 Kohorte

In dieser Studie wurden mehr als 700 Patienten untersucht, die sich einer Gallenblasenentfernung, bei symptomatischer Gallensteinerkrankung unterzogen haben. Diese Studie ist somit eine der größten Studien auf diesem Gebiet bis heute. Trotzdem konnten keine signifikanten Ergebnisse erbracht werden. Reicht die Fallzahl vielleicht doch nicht aus? Andere Studien, deren Fallzahlen deutlich niedriger waren, als die der vorliegenden Studie, konnten Signifikanz nachweisen. *Rosmorduc et al. (2003)* zum Beispiel erreichten mit einer Kohortengröße von 93 Probanden das Signifikanzniveau. Trotz der großen Kohorte dieser Arbeit, im Vergleich mit Kohorten anderer Arbeiten, ist nicht auszuschließen, dass mit einer noch größeren Kohorte das Signifikanzniveau erreicht worden wäre und die hier untersuchten Kandidatengene mit der Gallensteinerkrankung in Verbindung gebracht werden könnten. Dagegen spricht allerdings, dass mit derselben Kohorte signifikante Ergebnisse nur für den hepatischen Cholesterol-Transporter *ABCG8* erreicht worden sind (*Buch et al. 2008*). Weitere Punkte sind das Rekrutierungsgebiet und das durchschnittliche Erkrankungsalter für die Gallensteinerkrankung. Für populationsgenetische Studien ist die Wahl des Rekrutierungsgebietes von großer Bedeutung. Um ein möglichst homogenes Rekrutierungsgebiet zu bekommen, das heißt möglichst alle Kliniken in einem bestimmten Gebiet, mit einer möglichst geringen Fluktuation der Patienten, für signifikante und vor allem repräsentative Aussagen, wurde für das Biodatenbankprojekt **popgen** das nördliche Schleswig-Holstein ausgesucht. Hier hat man mit der Grenze im Norden zu Dänemark, im Süden den Nord-Ostsee-Kanal, im Westen die Nordsee und im Osten die Ostsee als Grenzen. Dadurch, dass dieser Raum relativ begrenzt ist und die Bevölkerung allein aus geographischen Gründen kaum die Möglichkeit nutzt, Krankenhäuser außerhalb dieses Gebietes aufzusuchen, macht dieses Gebiet zu einem idealen Gebiet für populationsgenetische Forschungen. Allerdings hat man dadurch auch ein sehr eingeschränktes Kollektiv, dass der Bevölkerung in Deutschland nicht entsprechen muss. So könnte es zum Beispiel sein, dass durch andere Ernährungsgewohnheiten, die durch das ländliche Milieu geprägt sind, die

Erkrankungshäufigkeit für die Gallensteinerkrankung hier auch besonders niedrig oder hoch sein könnte, allerdings gibt es keine historische, demographische oder genetische Hinweise darauf, dass diese Region hinsichtlich der Umstände, die zum Auftreten komplexer Erkrankungen beitragen, wesentlich von anderen Gegenden Deutschlands abweicht (*Krawczak et al. 2006*). Auch die Altersstruktur könnte sich zum Beispiel im Vergleich zu Großstädten unterscheiden. Dies hätte dann eventuell auch Einfluss auf das durchschnittliche Erkrankungsalter, welches in Norddeutschland bei 65 Jahren liegt (*Völzke et al. 2005*). Bis zu diesem Alter entwickeln schätzungsweise 50% der Patienten diese Erkrankung. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurden nur Patienten in diese Studie eingeschlossen, die ein Erkrankungsalter vor dem vollendeten 65. Lebensjahr hatten. Dies ergab dann bei den verwendeten Erkrankungsfällen ein Durchschnittsalter von 50 Jahren. Zur weiteren Erhöhung der Aussagekraft dieser Studie, wurde für die gallensteinnegative Kontrollgruppe (durch abdominelle Ultraschalluntersuchung gesichert) ein etwas höheres Durchschnittsalter (63 Jahre) gewählt. Die Auswahl, zum einen einer jungen Fallgruppe und einer etwas älteren Kontrollgruppe, basiert auf der Grundlage, dass für viele polygenische Erkrankungen ein enger Zusammenhang zwischen genetischem Einfluss und dem Erkrankungsbeginn besteht. Dieser Zusammenhang wurde unter anderem für die Entstehung von Brustkrebs (*Claus et al. 1990*) und für ein frühes Auftreten der Alzheimererkrankung bei entsprechender genetischer Disposition dargelegt. Es ist durchaus plausibel, dass sich der genetische Einfluss auf die Entwicklung solcher Krankheiten im Erkrankungsalter niederschlägt (*Pankratz et al. 2005*). Deshalb sollte die Erkrankungswahrscheinlichkeit durch die Auswahl jüngerer Probanden höher liegen, als die öfter beschriebene familiäre Risikoerhöhung. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um die Erbsubstanz einer Hochrisikogruppe, die eine höhere Aussagekraft bringen sollte, als die Erbsubstanz einer Gruppe aus der allgemeinen Bevölkerung. Auch das könnte zu Verfälschungen des Ergebnisses geführt haben, allerdings wäre hiermit dann eher zu erwarten, dass das Signifikanzniveau erreicht worden wäre.

In dieser Studie konnte keine Assoziation zwischen den Varianten der beiden geprüften Gene und der Gallensteinerkrankung festgestellt werden, obwohl versucht wurde, mit größtmöglicher Sorgfalt die oben besprochenen Problematiken, wie Kohortengröße, Rekrutierungsgebiet, Erkrankungsalter und etablierte Verfahren bei der molekulargenetischen Analyse zu minimieren. Die untersuchten Kandidatengene *ABCB11* und *LXRA* wirken somit nicht als wichtiger Risikofaktor bei der Entwicklung des Gallensteinleidens mit. Trotzdem

gibt es zahlreiche Belege, dass die genetische Komponente einen Anteil von knapp einem Drittel an der Entstehung dieser Erkrankung hat (*Katsika et al. 2005*). Dies macht weitere Forschung zu dieser Thematik notwendig. Eine mögliche Vorgehensweise, die zur Aufklärung der Wege der Gallensteinerkrankung führt, könnte eine genomweite Analyse der vorhandenen DNA- Proben der Patienten und Kontrollen sein. Dieses neue und daher kostenintensive Verfahren hat in Studien von *Hampe et al. (2006)* und *Zanke et al. (2007)* bereits zu signifikanten Ergebnissen geführt. So konnten Genorte ausfindig gemacht werden, deren Mutationen zum Teil Morbus Crohn (*Hampe et al. 2006*), bzw. Koloncarzinome (*Zanke et al. 2007*) auslösen können. Ferner konnte eine vor kurzem durchgeführte genomweite Untersuchung an der Kohorte, die auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, ebenfalls erste signifikante Ergebnisse bringen. Durch die neuartige Untersuchungsmethode konnte der hepatische Cholesteroltransporter ABCG8 als Suszeptibilitäts-Faktor für das humane Gallensteinleiden identifiziert werden. Dies bedeutet, dass durch genomweites Screenig zum ersten Mal ein Risikogen zum Gallensteinleiden beschrieben werden konnte (*Buch et al. 2008*). Die neu entdeckte Genvariante lässt das Ziel greifbar erscheinen, die Ursachen der Gallensteinerkrankung zu verstehen, um dann daraus neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Das Gallensteinleiden zählt zu den großen Volkskrankheiten in der westlichen Welt, von dem ca. 10-20% der Bevölkerung betroffen sind. Aufgrund von Lebensstil und steigender Lebenserwartung steigt die Prävalenz der Gallensteinträger zunehmend an. Jedes Jahr werden nur in Deutschland etwa 170000 Cholecystektomien durchgeführt, was Kosten von über einer Milliarde Euro verursacht. Um bessere Behandlungsmethoden herauszufinden wurden und werden verschiedene Anstrengungen unternommen, der Ursache des Gallensteinleidens näher zu kommen. So konnte bereits im Jahre 1925 eine genetische Komponente in der Ätiologie der Gallensteinerkrankung entdeckt werden. 1995 wurde ein Hauptgenlocus im Mausmodell entdeckt, der für die Prädisposition der Gallensteinerkrankung verantwortlich sein könnte. Dieser Locus ist *Lith1*, der die beiden funktionellen Kandidatengene *LXRA* als Transkriptionsfaktor und *ABCB11*, welches in Zusammenhang mit der fortschreitenden familiären Cholestase steht, beherbergt. Das Ziel dieser Studie ist die Untersuchung von *LXRA* und *ABCB11* als funktionelle Kandidatengene für die Gallensteinerkrankung beim Menschen. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Rekrutierungsplattform **popgen** 9991 Patienten, die sich einer Gallenblasenentfernung aufgrund symptomatischer Gallensteinerkrankung unterziehen mussten, angeschrieben, von denen letztlich 2623 teilnahmen. 736 dieser Patienten (mittleres Erkrankungsalter 50 Jahre) wurden dann mit 550 geschlechtsadaptierten Kontrollprobanden verglichen. Bei der Kontrollgruppe wurden sonographisch Gallensteine ausgeschlossen. Daraufhin erfolgte die Typisierung der gewählten markierenden und bekannt kodierenden SNPs für *ABCB11* (N=29) und *LXRA* (N=10). Als Ergebnis konnte keine Assoziation der beiden Gene, die eine wichtige Funktion im Gallensalzexport, Cholesterol- und Gallestoffwechsel einnehmen, mit dem humanen Gallensteinleiden nachgewiesen werden. Daraus ist zu folgern, dass *ABCB11* und *LXRA* nicht als relevante Risikogene beim humanen Gallensteinleiden infrage kommen. Eine weiterführende Feinuntersuchung unter anderem der *Lith1*-Region ist möglicherweise notwendig, um die ursächlichen genetischen Gründe der Gallensteinerkrankung in Mäusen und Menschen herauszufinden.

6 Literaturverzeichnis

Ahmed, A., Cheung, RC. and Keefe, EB.: Management of gallstones and their complications. *Am Fam Physician* 2000; 61(6): p. 1673-80, 1687-8

Altshuler, D., Brooks, LD., Chakravarti, A., Collins, FS., Daly, MJ., Donnelly, P.: A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437:1299-1320

Andersson, H., Bosaeus, I., Fasth, S., Hellberg, R., Hultén, L.: Cholelithiasis and urolithiasis in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22(2): p. 253-6

Angelico, M. and P. Della Guardia, Review article: hepatobiliary complications associated with total parenteral nutrition. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 2: p. 54-7

Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, MA., Salbert, G., Pfahl, M.: A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994 Oct; 14(10): 7025-35

Attili, A.F., De Santis, A., Capri, R., Repice, AM., Maselli, S.: The natural history of gallstones: the GREPCO experience. The GREPCO Group. *Hepatology* 1995; 21(3): p. 655-60

Aydogdu, I., Sari, R., Ulu, R., Sevinc, A.: The Frequency of Gallbladder Stones in Patients with Pernicious Anemia. *J Surg Res* 2001; 101(2): p. 120-123

Barbara, L., Sama, C., Morselli Labate, AM., Taroni, F., Rusticali, AG., Festi, D., Sapio, C., Roda, E., Banterle, C., Puci, A.: A population study on the prevalence of gallstone disease: the Sirmione Study. *Hepatology* 1987; 7(5): p. 913-7

Barrett, JC., Fry, B., Maller, J., Daly, MJ.: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265

Bender, R.; Lange, St.: Die Vierfeldertafel. Dtsch. Med. Wschr. 2001; 126: p. T36–T 38

Bertomeu, A., Ros, E., Zambon, D., Vela, M., Perez-Ayuso, RM., Targarona, E., Trías, M., Sanllehy, C., Casals, E., Ribó, JM: Apolipoprotein E polymorphism and gallstones. Gastroenterology 1996; 111(6):1603-1610

BQS Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung: Qualität sichtbar machen. BQS-Qualitätsbericht 2003, 2004; 31-39. Düsseldorf: BQS

Brink, M.A., Slors, JF., Keulemans, YC., Mok, KS., De Waart, DR., Carey, MC., Groen, AK., Tytgat, GN.: Enterohepatic cycling of bilirubin: a putative mechanism for pigment gallstone formation in ileal Crohn's disease. Gastroenterology 1999; 116(6): p. 1420-7

Buch, S., Schafmayer, C., Völzke, H., Becker, C., Franke, A., von Eller-Eberstein, H., Kluck, C., Bässmann, I., Brosch, M., Lammert, F., Miquel, JF., Nervi, F., Wittig, M., Roskopf, D., Timm, B., Höll, C., Seeger, M., ElSharawy, A., Lu, T., Egberts, J., Fändrich, F., Fölsch, UR., Krawczak, M., Schreiber, S., Nürnberg, P., Tepel, J., Hampe, J.: A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. Nat Genet. 2007; Aug;39(8):995-9. Epub 2007 Jul 15

Cesmeli, E., Elewaut, AE., Kerre, T., De Buyzere, M., Afschrift, M., Elewaut, A.: Gallstone recurrence after successful shock wave therapy: the magnitude of the problem and the predictive factors. Am J Gastroenterol 1999; 94(2): p. 474-9

Chaar, V.; Keclard, L.; Diara, J.P.; Leturdu, C.; Elion, J.; Krishnamoorthy, R.; Clayton, J., Romana, M.: Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. Haematologica. 2005; 90: p. 188-199

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, MG., Zweibaum, A.: A survey of twenty cell lines. Cancer Res 1988; 48:1936-1942

Chawla, A., Puthumana, L. and Thuluvath, PJ.: Autonomic dysfunction and cholelithiasis in patients with cirrhosis. Dig Dis Sci 2001; 46(3): p. 495-8

Cholelithiasis: 17685 Behandlungsdokumentationen aus 154 Abteilungen, in Qualitätssicherung Chirurgie Nordrhein 1998; Ärztekammer Nordrhein

Cichon, S.: Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung. Deutsches Ärzteblatt 2002; 99. 46: p. A-3091 / B-2615 / C-2442

Claus, EB., Risch, NJ., Thompson, WD.: Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. Am J Epidemiol 1990; 131:961-972

Collins, FS., Brooks, LD., Chakravarti, A.: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res 1998; 8: 1229–1231

Corder, EH., Saunders, AM., Strittmatter, WJ., Schmechel, DE., Gaskell, PC., Small, GW., Roses, AD., Haines, JL., Pericak-Vance, MA.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 1993; 261: 921–923

Csendes, A., Becerra, M., Rojas, J., Medina, E.: Number and size of stones in patients with asymptomatic and symptomatic gallstones and gallbladder carcinoma: a prospective study of 592 cases. J Gastrointest Surg. 2000; 4(5): p. 481-5

del Giudice, E.M., Perrotta, S., Nobili, B., Specchia, C., d'Urzo, G., Iolascon, A.: Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. Blood 1999; 94(7): p. 2259-62

Diehl, A.K.: Gallstone size and the risk of gallbladder cancer. Jama 1983; 250(17): p. 2323-6

Downs, S.H.: Systematic review of the effectiveness and safety of laparoscopic cholecystectomy. Annals of the Royal College of Surgeons of England 1996; 78(3 Part II): p. 241-323

Doig, RK: Illness in twins III Cholelithiasis. Med. J. Aust. 1957; 44:716-717

Dudbridge, F.: Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. Genet. Epidemiol. 2003; 25: p.115-121

Dupont, W.D.; Plummer, W.D.: PS power and sample size program available for free on the Internet. *Controlled Clin. Trials* 1997; 18: p. 274

Durst, RY., Burvin, R., Eitan, A., Barzilay, A: A familial risk factor in cholesterol gallstone disease. *J Clin Gastroenterol* 1996; 23:289-291

Fischer, S., Dolu, M.H., Zundt, B., Meyer, G., Geisler, S., Jungst, D.: Apolipoprotein E polymorphism and lithogenic factors in gallbladder bile. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001; 31: p. 789-795

Fracchia, M., Pellegrino, S., Secreto, P., Gallo, L., Masoero, G., Pera, A., Galatola, G.: Biliary lipid composition in cholesterol microlithiasis. *Gut* 2001; 48:702-706

Freudenberg, J., Cichon, S., Nöthen, M., Propping, P.: Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Deutsches Ärzteblatt* 99 2002; 47: p. A-3190 / B-2691 / C-2506

Friedman, G.D., Raviola, CA. and Fireman, B.: Prognosis of gallstones with mild or no symptoms: 25 years of follow-up in a health maintenance organization. *J Clin Epidemiol* 1989; 42(2): p. 127-36

Fullerton, SM., Clark, AG., Weiss, KM., Nickerson, DA., Taylor, SL., Stengård, JH., Salomaa, V., Vartiainen, E., Perola, M., Boerwinkle, E., Sing, CF.: Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet* 2000; 67:881-900

Gallbladder disease as a side effect of drugs influencing lipid metabolism. Experience in the Coronary Drug Project. *N Engl J Med* 1977; 296(21): p. 1185-90

Garber, S.M., Korman, J., Cosgrove, JM., Cohen, JR.: Early laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis. *Surg Endosc* 1997; 11(4): p. 347-50

Gilat, T., Feldman, C., Halpern, Z., Dan, M., Bar Meir, S.: An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterology* 1983; 84:242-246

Goto, K., Sugiyama, K., Sugiura, T., Ando, T., Mizutani, F., Terabe, K., Ban, K., Togari, H.: Bile salt export pump gene mutations in two Japanese patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:647-650

Gracie, W.A. and Ransohoff, DF.: The natural history of silent gallstones: the innocent gallstone is not a myth. *N Engl J Med* 1982; 307(13): p. 798-800

Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, PJ., Mirza, MM., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, AJ., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, JE., Foelsch, UR., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., Mathew, CG.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-1928

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, FM., Briggs, J., Günther, S., Prescott, NJ., Onnie, CM., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, UR., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, CG., Krawczak, M., Schreiber, S.: A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007; Feb;39(2):207-11

Hardy, KJ., Miller, H., Fletcher, DR., Jones, RM., Shulkes, A., McNeil, JJ.: An evaluation of laparoscopic versus open cholecystectomy. *Med J Aust* 1994; 160(2): p. 58-62

Harvald, B., Hauge, M.: A catamnestic investigation of Danish twins; a preliminary report. *D Dan Med Bull* 1956; 3:150-8

Haverfield, E.V., McKenzie, C.A., Forrester, T., Bouzekri, N., Harding, R., Serjeant, G., Walker, T., Peto, TE, Ward, R., Weatherall, DJ.: UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. *Blood* 2005; 105: p. 968-972

Horikawa, Y., Oda, N., Cox, NJ., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, TH., Mashima, H., Schwarz, PE., del Bosque-Plata, L., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, KS., Wie, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, LJ., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, CL., Bell, GI.: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000; 26: 163–175

Howard, DE. and Fromm, H.: Nonsurgical management of gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 1999; 28(1): p. 133-44

Huddy, GPB.: A study of the family histories of 300 patients suffering from chronic upper abdominal lesions. *Lancet* 1925; 2:276-278

Hugot, JP., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, JP., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, CA., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, JF., Sahbatou, M., Thomas, G.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599–603

Inkinen, J., Sand, J. and Nordback, I.: Association between common bile duct stones and treated hypothyroidism. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(34): p. 919-21

Jackson, CE., Gay, BC.: Inheritance of gall-bladder disease. *Surgery* 1959; 46:853-857

Jansen, PL., Strautnieks, SS., Jacquemin, E., Hadchouel, M., Sokal, EM., Hooiveld, GJ., Koning, JH., De Jager-Krikken, A., Kuipers, F., Stellaard, F., Bijleveld, CM., Gouw, A., Van Goor, H., Thompson, RJ., Müller, M.: Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1999; 117:1370-1379

Jarvinen, H.J. and Hastbacka, J.: Early cholecystectomy for acute cholecystitis: a prospective randomized study. *Ann Surg*, 1980; 191(4): p. 501-5

Jensen, KH. and Jorgensen, T.: Incidence of gallstones in a Danish population. *Gastroenterology* 1991; 100(3): p. 790-4

Johnston, D.E. and Kaplan, M.M.: Pathogenesis and treatment of gallstones. *N Engl J Med* 1993; 328(6): p. 412-21

Jorgensen T.: Prevalence of gallstones in a Danish population. *Amer J Epidemiol* 1987; 126: 912-921

Jorgensen T: Gallstones in a Danish population: familial occurrence and social factors. *J Biosoc Sci* 1988; 20:111-120

Jorgensen, T.: Gall stones in a Danish population. Relation to weight, physical activity, smoking, coffee consumption, and diabetes mellitus. *Gut* 1989; 30(4): p. 528-34

Juvonen, T., Kervinen, K., Kairaluoma, M.I., Lajunen, L.H., Kesäniemi, Y.A.: Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology* 1993; 104:1806-1813

Juvonen, T.; Savolainen, M.J.; Kairaluoma, M.I.; Lajunen, L.H.; Humphries, S.E.; Kesäniemi, Y.A.: Polymorphisms at the apoB, apoA- I, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. *J. Lipid. Res.* 1995; 36: p. 804-812

Katsika, D., A. Grjibovski, C. Einarsson, Lammert, F., Lichtenstein, P., Marschall, H.U.: Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: a Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology* 2005; 41:1138-43

Kesäniemi, A.Y., Koskenvuo, M. Vuoristo, M., Miettinen, T.A.: Biliary lipid composition in monozygotic and dizygotic pairs of twins. *Gut* 1989; 30:1750-6

Khanuja, B., Cheah, Y, Hunt, M., Nishina, P., Wang, D., Chen, H., Billheimer, J., Carey, M., Paigen, B.: *Lith1*, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. Genetics* 1995; USA Vol.92, pp. 7729-7733

Körner, G.: Über die familiäre Häufung der Gallenblasenkrankheiten. *Zeitschrift der menschlichen Vererbungs- und Konstitutionslehre* 1937; (20): p. 526-582

Koutselinis, A., Boukis, D., Kalapothaki, V., Sparros, L., Trichopoulos, D.: Postmortem study of the prevalence of gallstones in Athens. *Digestion* 1975; 13(5):304-7

Kratzer, W., Kächele, V., Mason, RA., Hill, V., Hay, B., Haug, C., Adler, G., Beckh, K., Muche, R.: Gallstone prevalence in Germany: the Ulm Gallbladder Stone Study. *Dig Dis Sci* 1998; 43:1285-91

Kratzer, W., Mason, RA., Kächele, V.: Prevalence of gallstones in sonographic surveys worldwide. *J Clin Ultrasound* 1999; 27: 1-7

Krawczak, M., Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, PJ., El Mokhtari, NE., Schreiber, S.: PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet.* 2006; 9(1):55-61

Kullak-Ublick, GA., Stieger, B., Meier, PJ.: Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004; 126:322-342

Lammert, F., Sauerbruch, T.: Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; Sep; 2(9): p. 423-33. Review

Lammert, F., Wang, DQ., Wittenburg, H., Bouchard, G., Hillebrandt, S., Taenzler, B., Carey, MC., Paigen, B.: Lith genes control mucin accumulation, cholesterol crystallization, and gallstone formation in A/J and AKR/J inbred mice. *Hepatology* 2002; 36:1145-1154

Leuschner, U.: In vitro gallstone dissolution. *Gastroenterology* 1986 Oct; 91(4):1035

Li, AC., Glass, CK.: PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004; 45:2161-2173

Li, C.P., Hwang, SJ., Lee, FY., Chang, FY., Lin, HC., Lu, RH., Chu, CJ., Lee, SD.: Evaluation of gallbladder motility in patients with liver cirrhosis: relationship to gallstone formation. *Dig Dis Sci* 2000; 45(6): p. 1109-14

Liver Disease Subcommittee of the Digestive Disease Interagency Coordinating Committee. Action plan for liver disease research 2005; 145–150. Bethesda: NIH

Lowenfels, A.B., Lindström, CG., Conway, MJ., Hastings, PR.: Gallstones and risk of gallbladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75(1): p. 77-80

Lowenfels, A.B., Walker, AM., Althaus, DP., Townsend, G., Domellöf, L.: Gallstone growth, size, and risk of gallbladder cancer: an interracial study. *Int J Epidemiol* 1989; 18(1): p. 50-4

Lyons, M.A., Wittenburg, H., Li, R., Walsh, K.A., Leonard, M.R., Korstanje, R., Churchill, G.A., Carey, M.C., Paigen, B.: Lith 6: a new QTL for cholesterol gallstones from an intercross of CAST/Ei and DBA/2J inbred mouse strains. *J. Lipid. Res.* 2003; Sep; 44(9): p. 1763-71. E.pub. Jun 16

Majeed, A.W., Troy, G., Nicholl, JP., Smythe, A., Reed, MW., Stoddard, CJ., Peacock, J., Johnson, AG.: Randomised, prospective, single-blind comparison of laparoscopic versus small-incision cholecystectomy. *Lancet* 1996; 347(9007): p. 989-94

Makishima, M.: Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* 2005; 97:177-183

McArthur, P., Cuschieri, A., Sells, RA., Shields, R.: Controlled clinical trial comparing early with interval cholecystectomy for acute cholecystitis. *Br J Surg*, 1975; 62(10): p. 850-2

Mitttemeyer, J.: Familienbasierte Assoziationstest bei fehlenden Daten. Dissertation. Institut f. Medizinische Biometrie und Epidemiologie d. Philipps-Universität Marburg 2001

Niemi, M., Kervinen, K., Rantala, A., Kauma, H., Paivansalo, M., Savolainen, MJ., Lilja, M., Kesäniemi, YA.: The role of apolipoprotein E and glucose intolerance in gallstone disease in middle aged subjects. *Gut* 1999; 44(4):557-562

Noe, J., Hagenbuch, B., Meier, PJ., St-Pierre, MV.: Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001; 33:1223-1231

Noe, J., Stieger, B., Meier, PJ.: Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123:1659-1666

Noe, J., Kullak-Ublick, GA., Jochum, W., Stieger, B., Kerb, R., Haberl, M., Müllhaupt, B., Meier, PJ., Pauli-Magnus, C.: Impaired expression and function of the bile salt export pump due to three novel ABCB11 mutations in intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 2005; 43:536-543

Nürnberg, D., Berndt, H., Pannwitz, H.: Familiäre Häufung von Gallensteinen. *Dtsch. Med. Wschr.* 1989; 114: p. 1059-1063

Ogura, Y., Bonen, DK., Inohara, N., Nicolae, DL., Chen, FF., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, RH., Achkar, JP., Brant, SR., Bayless, TM., Kirschner, BS., Hanauer, SB., Nuñez, G., Cho, JH.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603–606

Ott, J.: Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am. J. Hum. Genet.* 1974; 26: p. 588-597

Paigen, B., Schork, NJ., Svenson, KL., Cheah, YC., Mu, JL., Lammert, F., Wang, DQ., Bouchard, G., Carey, MC.: Quantitative trait loci mapping for cholesterol gallstones in AKR/J and C57L/J strains of mice. *Physiol Genomics* 2000; 4:59-65

Paigen, B. and Carey, MC.: Gallstones. In *The genetic basis of common diseases* (eds King RA et al.) London: Oxford University Press 2002; 298–335

Pankratz, VS., de Andrade, M., Therneau, TM.: Random-effects Cox proportional hazards model: general variance components methods for time-to-event data. *Genet Epidemiol* 2005; 28:97-109

Pankratz, N., Byder, L., Halter, C., Rudolph, A., Shults, CW., Conneally, PM., Foroud, T., Nichols, WC.: Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord* 2005

Pauletzki, J., Sailer, C., Klüppelberg, U., von Ritter, C., Neubrand, M., Holl, J., Sauerbruch, T., Sackmann, M., Paumgartner, G.: Gallbladder emptying determines early gallstone clearance after shock- wave lithotripsy. *Gastroenterology* 1994; 107(5): p. 1496-502

Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., Verhagen, A., Rivera, C.R., Mulvihill, S.J., Malloy, M.J., Kane, J.P.: Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* 2002; 10:p109-117

Ransohoff, DF. and Gracie, WA.: Treatment of gallstones. *Ann Intern Med* 1993; 119(7 Pt 1): p. 606-19

Roses, AD.: A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurogenetics* 1997; 1: 3–11

Rosmorduc, O., Hermelin, B., Poupon, R.: MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001; 120:1459-1467

Rosmorduc, O., Hermelin, B., Boelle, P.Y., Parc, R., Taboury, J., Poupon, R.: ABCB4 gene mutation- associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003; 125: p. 452-459

Sabol, SL., Brewer, HB., Santamarina-Fojo, S.: The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 2005; 46:2151-2167

Sackmann, M., Pauletzki, J., Sauerbruch, T., Holl, J., Schelling, G., Paumgartner, G.: The Munich Gallbladder Lithotripsy Study. Results of the first 5 years with 711 patients. *Ann Intern Med* 1991; 114(4): p. 290-6

Sackmann, M., Pauletzki, J., Delius, M., Holl, J., Neubrand, M., Sauerbruch, T., Paumgartner, G.: Noninvasive therapy of gallbladder calculi with a radiopaque rim. *Gastroenterology* 1992; 102(3): p. 988-93

Sackmann, M., Niller, H., Klueppelberg, U., von Ritter, C., Pauletzki, J., Holl, J., Berr, F., Neubrand, M., Sauerbruch, T., Paumgartner, G.: Gallstone recurrence after shock-wave therapy. *Gastroenterology* 1994; 106(1): p. 225-30

Sandler, RS., Everhart, JE., Donowitz, M., Adams, E., Cronin, K., Goodman, C., Gemmen, E., Shah, S., Avdic, A., Rubin, R.: The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 2002; 122: 1500–1511

Sarin, SK., Negi, VS., Dewan, R., Sasan, S., Saraya, A.: High familial prevalence of gallstones in the first-degree relatives of gallstone patients. *Hepatology* 1995; 22(1):138-141

Saunders, AM., Strittmatter, WJ., Schmechel, D., George-Hyslop, PH., Pericak-Vance, MA., Joo, SH., Rosi, BL., Gusella, JF., Crapper-MacLachlan, DR., Alberts, MJ.: Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467–1472

Sauerbruch, T., Delius, M., Paumgartner, G., Holl, J., Wess, O., Weber, W., Hepp, W., Brendel, W.: Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves. *N Engl J Med* 1986; 314(13): p. 818-22

Sauerbruch, T., Feussner, H., Frimberger, E., Hasegawa, H., Ihse, I., Riemann, JF., Yasuda, H.: Treatment of common bile duct stones. A consensus report. *Hepatogastroenterology* 1994; 41(6): p. 513-5

Schafmayer, C., Hartleb, J., Tepel, J., Albers, S., Freitag, S., Völzke, H., Buch, S., Seeger, M., Timm, B., Kremer, B., Fölsch, UR., Fändrich, F., Krawczak, M., Schreiber, S., Hampe, J.: Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany. *BMC Gastroenterol.* 2006; Nov 22, 6:36

Schafmayer, C., Völzke, H., Buch, S., Egberts, J., Spille, A., von Eberstein, H., Franke, A., Seeger, M., Hinz, S., Elsharawy, A., Roskopf, D., Brosch, M., Krawczak, M., Foelsch, UR., Schafmayer, A., Lammert, F., Schreiber, S., Faendrich, F., Hampe, J., Tepel, J.: Investigation of the Lith6 candidate genes APOBEC1 and PPARG in human gallstone disease. *Liver Int.* 2007; Sep 27, (7):910-9

Schafmayer, C., Freitag-Wolf, S., Wolken, H., Buch, S., Brosch, M., Egberts, JH., Shekarriz, H., Fölsch, UR., Fändrich, F., Krawczak, M., Schreiber, S., Tepel, J., Hampe, J.: Increased heritability of gallstone disease in early onset cases. *Liver Int.* 2008; Jul 28, (6):895-7

Schwesinger, WH., Sirinek, KR. and Strodel, WE.: Laparoscopic cholecystectomy for biliary tract emergencies: state of the art. *World J Surg* 1999; 23(4): p. 334-42

Shinar, DM., Endo, N., Rutledge, SJ., Vogel, R., Rodan, GA., Schmidt, A.: NER a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene.* 1994; Sep 30; 147(2):273-6

Shoda, J., Oda, K., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Ito, K., Cohen, DE., Feng, L., Kamiya, J., Nimura, Y., Miyazaki, H., Kano, M., Matsuzaki, Y., Tanaka, N.: Etiologic significance of defects in cholesterol, phospholipid, and bile acid metabolism in the liver of patients with intrahepatic calculi. *Hepatology* 2001; 33:1194-1205

Soetikno, R.M. and Carr-Locke, DL.: Endoscopic management of acute gallstone pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998; 8(1): p. 1-12

Stampfer, MJ., Maclure, KM., Colditz, GA., Manson, JE., Willett, WC.: Risk of symptomatic gallstones in women with severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1992; 55(3): p. 652-8

Steiner, C.A., Bass, EB., Talamini, MA., Pitt, HA., Steinberg, EP.: Surgical rates and operative mortality for open and laparoscopic cholecystectomy in Maryland. *N Engl J Med* 1994; 330(6): p. 403-8

Strasberg, SM., Hertl, M. and Soper, NJ.: An analysis of the problem of biliary injury during laparoscopic cholecystectomy. *J Am Coll Surg* 1995; 180(1): p. 101-25

Strautnieks, SS., Bull, LN., Knisely, AS., Kocoshis, SA., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, MS., Kagalwalla, AF., Németh, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, NB., Gardiner, RM., Thompson, RJ.: A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20:233-238

The Rome Group for Epidemiology and Prevention of Cholelithiasis (GREPCO).

The epidemiology of gallstone disease in Rome, Italy. Part II. Factors associated with the disease. *Hepatology* 1988; 8(4): p. 907-13

The Southern Surgeons Club: A prospective analysis of 1518 laparoscopic cholecystectomies. *N Engl J Med* 1991; 324: 1073–1078

Thistle, JL., Cleary, PA., Lachin, JM., Tyor, MP., Hersh, T.: The natural history of cholelithiasis: the National Cooperative Gallstone Study. *Ann Intern Med* 1984; 101(2): p. 171-5

Thistle, J.L.: Pathophysiology of bile duct stones. *World J Surg*, 1998; 22(11): p. 1114-8

Usui, R., Ise, H., Kitayama, O., Suzuki, N., Matsuno, S.: Pathogenesis of black gallstones associated with hemolytic disease. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1991; 88(7): p. 1426-35

Van der Linden, W., Lindelöf, G.: The familial occurrence of gallstone disease. *Acta Genet* 1965; 15:159-164

Van der Linden, W. and Sunzel, H.: Early versus delayed operation for acute cholecystitis. A controlled clinical trial. *Am J Surg* 1970. 120(1): p. 7-13

Van der Linden, W., Simonson, N.: Familial occurrence of gallstone disease. Incidence in parents of young patients. *Hum. Hered.* 1973; 23(2): p. 123-7.1

Van der Velpen, G.C., Shimi, SM. and Cuschieri, A.: Outcome after cholecystectomy for symptomatic gall stone disease and effect of surgical access: laparoscopic v open approach. Gut 1993; 34(10): p. 1448-51

Völzke, H., Baumeister, S.E., Alte, D., Hoffmann, W., Schwahn, C., Simon, P., John, U., Lerch, MM.: Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. Digestion 2005; 71: p. 97-105

Walters, J.R., Hood, KA., Gleeson, D., Ellul, JP., Keightley, A., Murphy, GM., Dowling, RH.: Combination therapy with oral ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acids: pretreatment computed tomography of the gall bladder improves gall stone dissolution efficacy. Gut 1992; 33(3): p. 375-80

Wasmuth, HE., Keppeler, H., Herrmann, U., Schirin-Sokhan, R., Barker, M., Lammert, F.: Coinheritance of Gilbert syndrome associated UGT1A1 mutation increases the gallstone risk in cystic fibrosis. Hepatology 2006

Weinhofer, I., Kunze, M., Rampler, H., Bookout, AL., Forss-Petter, S., Berger, J.: LXRalpha interferes with SREBP1c-mediated Abcd2 expression: Novel cross-talk in gene regulation. J Biol Chem 2005

Willy, PJ., Umesono, K., Ong, ES., Evans, RM., Heyman, RA., Mangelsdorf, DJ.: LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev. 1995; May 1; 9(9):1033-45

Wittenburg, H., Lyons, MA., Li, R., Churchill, GA., Carey, MC., Paigen, B.: FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. Gastroenterology 2003; 125:868-881

Wjst, M.: Asthma-Genetik: Der Countdown läuft. Pädiatrische Allergologie 2001; 2/01: 6-8

Zanke, BW., Greenwood, CM., Rangrej, J., Kustra, R., Tenesa, A., Farrington, SM., Prendergast, J., Olschwang, S., Chiang, T., Crowdy, E., Ferretti, V., Laflamme, P., Sundararajan, S., Roumy, S., Olivier, JF., Robidoux, F., Sladek, R., Montpetit, A., Campbell, P., Bezieau, S., O'Shea, AM., Zogopoulos, G., Cotterchio, M., Newcomb, P., McLaughlin, J., Younghusband, B., Green, R., Green, J., Porteous, ME., Campbell, H., Blanche, H., Sahbatou, M., Tubacher, E., Bonaiti-Pellié, C., Buecher, B., Riboli, E., Kury, S., Chanock, SJ., Potter, J., Thomas, G., Gallinger, S., Hudson, TJ., Dunlop, MG.: Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet. 2007; 39(8): 989-94

Ziegler, A.: Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft. Dtsch. Ärzteblatt 2002; 99(36): A-2342 / B-1996 / C-1878 MEDIZIN

7 Anhang

Abbildung 12: Fragebogen für die Erhebung der Gallensteinerkrankung

Auf dieser und den folgenden vier Seiten ist der Gallensteinfragebogen abgebildet, den die Patienten zur Erhebung der Daten zusammen mit dem Blutentnahmeset und der Einverständniserklärung zugeschickt bekommen haben.

**Fragebogen zur
Schleswig- Holsteinischen Studie
„Gesundheit für Generationen“**

Genetische Ursachen des Gallensteinleidens



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein



Nationales
Genomforschungsnetz

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Herzlich willkommen! Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen.

Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Ihre persönlichen Daten ausgewertet.

Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern:

1)	Heutiges Datum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
2)	Geschlecht	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich			
3)	Geburtsdatum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
4)	Körpergröße (cm):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
	Gewicht (kg):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
5)	Sind Sie in Deutschland geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Sind Sie in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Sind Sie in Kiel geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren? Land: _____				
6)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Ist Ihr Vater in Kiel geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren? Land: _____				
7)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Ist Ihre Mutter in Kiel geboren? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren? Land: _____				
8)	Haben Sie Kinder? <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja </div> Wenn ja, wie viele? Anzahl: <input type="text"/> <input type="text"/>				

9) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?

- ☐ sehr gut
- ☐ gut
- ☐ weniger gut
- ☐ schlecht

10) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?

11) Haben oder hatten Sie jemals in Ihrem Leben eine schwere Erkrankung?

- ☐ nein
- ☐ ja

Wenn ja, welche? _____

Im Folgenden werden Sie zum Gallensteinleiden befragt:

11) Wann wurden bei Ihnen erstmals Gallensteine festgestellt?

Jahr: oder damaliges Alter:

12) Wann wurden Sie operiert?

Jahr: oder damaliges Alter:

13) Was waren das für Gallensteine?

- ☐ Cholesterinsteine
- ☐ Pigmentsteine
- ☐ ich weiß nicht

14) Wie haben sich die Gallensteine bemerkbar gemacht? Mehrfachnennungen sind möglich.

- ☐ Gallenkoliken
- ☐ Bauchschmerzen
- ☐ Entzündung der Gallenwege
- ☐ Entzündung der Bauchspeicheldrüse
- ☐ Ultraschall-Untersuchung
- ☐ ich weiß nicht
- ☐ sonstiges: _____

15) Haben Sie häufig Diäten gemacht, um abzunehmen?

- ☐ nein
- ☐ ja, unregelmäßig
- ☐ ja, regelmäßig

Anzahl:

16) Welche Medikamente haben Sie regelmäßig eingenommen festgestellt wurden?

Viele Patienten berichten über ein gehäuftes Auftreten von Gallensteinen in der Familie.

Dieser Frage möchten wir besonders genau nachgehen:

17) Bitte kreuzen Sie in der folgenden Tabelle an (✕), wieviele Geschwister und / oder Kinder Sie haben und wer davon verstorben ist. Geben Sie das jetzige Alter an bzw. das Alter zum Todeszeitpunkt. Bitte tragen Sie ein, wer aus Ihrer Familie Gallensteine hat / hatte und an der Galle operiert wurde. **Auch wenn keiner Ihrer Familienangehörigen Gallensteine hatte, füllen Sie bitte den dickumrandeten Teil der Tabelle aus.**

Familienangehörige/r			jetziges Alter	Gallensteine	An der Galle	
	Haben / verstorben		bzw. Alter bei	festgestellt	operiert?	
	hatten Sie		Todeszeitpunkt			
(Lebens-) Ehepartner	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Mutter	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Vater	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Bruder 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Bruder 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Bruder 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Schwester 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Schwester 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Schwester 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tochter 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tochter 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sohn 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sohn 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Haben Sie weitere Kinder oder Geschwister, und wer davon hat / hatte Gallensteine?

Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung! Bitte beachten Sie auch die nächste Seite.

Wir haben noch einige abschließende Fragen an Sie: Wir können Ihnen leider keine persönlichen

Untersuchungsergebnisse der genetischen Analysen mitteilen. Aufgrund vieler Rückfragen von

Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner**

Informationen zum Fortgang des Projektes.

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ☐ ja, ich möchte weiter informiert werden
- ☐ ja, ich möchte per E-Mail informiert werden: _____
- ☐ nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

Wenn Sie an den Untersuchungsergebnissen Ihrer Gallensteinprobe interessiert sind, werden wir

Ihren Namen und Ihre Adresse in einer separaten Adressdatei aufbewahren.

- ☐ ja, ich möchte über die Ergebnisse der Gallensteinuntersuchung informiert werden
- ☐ ja, ich möchte per E-Mail informiert werden: _____
- ☐ nein, ich möchte nicht informiert werden

In Zukunft werden Folgestudien zu dieser Untersuchung durchgeführt. Wir würden uns freuen,

wenn auch Sie wieder daran teilnehmen. In diesem Fall werden wir Ihren Namen und Ihre

Adresse getrennt von Ihren Studiendaten für eine erneute Kontaktaufnahme zu Beginn der

Folgestudie speichern.

Sind Sie bereit, an einer Folgestudie teilzunehmen?

- ☐ ja
- ☐ nein

Haben Sie Fragen, wenden Sie sich bitte an das **popgen**-Team (Tel.: 0431/597-3710). Sie können uns auch eine E-mail schicken: info@popgen.de

Nochmals vielen Dank! Und alles Gute für Sie!

Abbildung 13: Einverständniserklärung

Auf der folgenden Seiten ist die Einverständniserklärung abgebildet, welche die Patienten zusammen mit dem Blutentnahmeset und dem Gallensteinfragebogen zugeschickt bekommen haben und der bei Teilnahme durch die Forschungsgruppe **popgen** archiviert wurde.

POPGEN- STUDIE: GENETISCHE URSACHEN DES GALLENSTEINLEIDENS
EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

Ich willige in die Entnahme von 30 ml Blut und die Speicherung der in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten ein. Das Eigentum an diesem Material geht damit an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein über.

Ich hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit zur Entscheidung. Mir ist bekannt, dass durch eine Nicht-Teilnahme keinerlei Nachteile für mich entstehen können.

Ich erteile die Genehmigung zur Einsicht in vorhandene Patientenunterlagen bei «clinic» durch den/die verantwortliche/n Studienarzt/-ärztin.

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung jederzeit widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Mir ist bekannt, dass ich zusätzliche Fragen in einem persönlichen Gespräch mit dem/der verantwortlichen Studienarzt/-ärztin klären kann.

....., den 2006

Unterschrift:

.....

Abbildung 14: Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Auf dieser und den folgenden beiden Seiten ist das Merkblatt zur Einwilligungserklärung abgebildet, welches ebenfalls Bestandteil des zugeschickten Päckchens war. Mit diesem Merkblatt wurden die Patienten über rechtliche Aspekte aufgeklärt.

Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Wir führen an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein in Kiel das Forschungsvorhaben popgen zur genetischen Veranlagung von weit verbreiteten Krankheiten durch. Untersucht werden dabei chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarm, Darmkrebs, Gallensteine, Erkrankungen der Herzkranzgefäße (KHK), entzündliche Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates und einige neurologische Erkrankungen wie Krampfleiden und Morbus Parkinson (Schüttellähmung). Um unsere Forschungserkenntnisse überprüfen zu können, bitten wir Sie um die Einwilligung, Ihnen 30 ml peripher venöses Blut entnehmen zu dürfen und die daran gewonnen genetischen Daten ebenso wie Ihre zusätzlichen Angaben auf dem beiliegenden Fragebogen ausschließlich zu den oben genannten Forschungszwecken zu speichern. Wir beabsichtigen, aus Ihrem Blut DNA (Erbsubstanz) zu gewinnen, um die genetische Veranlagung zu einer der oben genannten Erkrankungen zu überprüfen. Die dafür verantwortlichen Gene können sich überall im gesamten Erbgut befinden. Es werden jedoch nur die jeweils als relevant bekannten Gene untersucht.

Risiken der Blutentnahme:

Wie zu einer Routineblutentnahme werden Ihnen unter sterilen Bedingungen 30 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dazu ist die Punktion einer Vene notwendig. Die Risiken einer Blutentnahme sind: Lokale Infektion ("bakterielle Entzündung, Vereiterung"), Fehlpunktion der Vene und anschließende Ausbildung eines Blutergusses (Hämatom), sehr selten Fehlpunktion einer Schlagader. Alle oben genannten Risiken sind bei sachgemäßer Durchführung extrem selten.

Speicherung von Daten:

Ihre persönlichen Daten (Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum) werden getrennt von den Probanden gespeichert. Die Proben werden durch eine fortlaufende Strichkodierung pseudonymisiert. Die mit der Probe verbundenen Informationen (d.h. Angaben aus dem Fragebogen, Genotypen) sind nur über diese Kodierung abrufbar. Zur Qualitätskontrolle

unserer Daten bitten wir Sie um die Genehmigung, vorhandene Patientenunterlagen einsehen zu dürfen. Für diese spezielle Situation entbinden Sie den behandelnden Arzt von der Schweigepflicht gegenüber verantwortlichen ärztlichen Mitarbeitern des Forschungsvorhabens.

Auf die Daten haben nur autorisierte Mitarbeiter des Forschungsprojektes Zugriff. Da das Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe Ihrer Daten an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) ist ausgeschlossen. Die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Kooperationspartner erfolgt ohne Angaben zu Ihrer Person. Bei Beendigung der Forschungsaktivitäten (frühestens nach 20 Jahren) werden die Proben und die dazu gehörenden Daten vernichtet. Das Konzept zur Sammlung und Speicherung aller Daten wurde vom Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz und der Ethikkommission der Universitätsklinikums Schleswig- Holstein geprüft.

Die Herausgabe einzelner persönlicher Untersuchungsergebnisse ist aus forschungsmethodischen Gründen nicht möglich. Durch diese Untersuchungen wird eine Vielzahl von genetischen Merkmalen getestet werden. Es ist der Zweck der Untersuchung, eine Risikoabschätzung für bestimmte genetische Erkrankungen in der „Durchschnittsbevölkerung“ zu erstellen. Dieses schließt eine persönliche Risikobewertung nicht ein. Es ist daher nicht zu erwarten, dass sich durch die Untersuchungen persönlichkeitsrelevante Erkenntnisse ergeben. Auf Ihren Wunsch informieren wir Sie gerne über den allgemeinen Fortgang des Forschungsprojektes. In diesem Fall würden wir Ihren Namen, Ihren Vornamen und Ihre Adresse gemäß den datenschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Schleswig Holstein in einer gesonderten Adressdatei speichern, um Ihnen einen Projektbericht zusenden zu können.

Patentrechte

Es kann sein, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsergebnisse Patente entstehen, die auf Erkenntnissen basieren, die aus Ihren Proben gewonnen wurden. Solche Patente sind die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente. In diesem Fall besteht kein individueller Patentanspruch, basierend auf Ihrem individuellen biologischen oder genetischen Material.

Widerruf

Die Teilnahme an diesen wissenschaftlichen Untersuchungen ist absolut freiwillig. Solange Ihre persönlichen Daten nicht gelöscht sind, kann Ihre Zustimmung jederzeit widerrufen werden. Daraus entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Gegebenenfalls bereits entnommene Proben werden dann unverzüglich vernichtet, und Ihre Daten werden umgehend gelöscht. Einen etwaigen Widerruf Ihrer Zustimmung richten Sie bitte schriftlich an die Projektleitung popgen, 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Schittenhelmstr. 12, D- 24105 Kiel.

Weitere Fragen

Wünschen Sie ein weitergehendes, ausführliches Arztgespräch, so vereinbaren Sie bitte einen Termin unter 0431/597-3710.

Verantwortliche ärztliche Leitung Dr. med. Susanna Nikolaus	Studienarzt Dr. med. Jochen Hampe	Projektleitung Dipl. soz. Huberta von Eberstein

Abbildung 15: Fragebogen der Kontrollgruppe

Herzlich willkommen! Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Ihre persönlichen Daten ausgewertet. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern.				
1)	Heutiges Datum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
		Tag	Monat	Jahr
2)	Geschlecht	<input type="radio"/> männlich <input type="radio"/> weiblich		
3)	Geburtsdatum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
		Tag	Monat	Jahr
4)	Körpergröße (cm):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
	Gewicht (kg):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
5)	Sind Sie in Deutschland geboren?	ja	nein	
	Sind Sie in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	ja	nein	
	Sind Sie in Kiel geboren?	ja	nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren?			
	Land: _____			
6)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren?	ja	nein	
	Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	ja	nein	
	Ist Ihr Vater in Kiel geboren?	ja	nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren?			
	Land: _____			
7)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren?	ja	nein	
	Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-Kanals geboren?	ja	nein	
	Ist Ihre Mutter in Kiel geboren?	ja	nein	
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren?			
	Land: _____			

8) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?

sehr gut

gut

weniger gut

schlecht

9) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?

10) Bitte kreuzen Sie in der folgenden Tabelle an (✕), wieviele Geschwister und / oder Kinder Sie haben und wer davon verstorben ist. Geben Sie das jetzige Alter an bzw. das Alter zum Todeszeitpunkt. Bitte tragen Sie ein, wer aus Ihrer Familie Gallensteine hat / hatte und an der Galle operiert wurde. Auch wenn keiner Ihrer Familienangehörigen Gallensteine hatte, füllen Sie bitte den dickumrandeten Teil der Tabelle aus.

Familienangehörige/r			jetziges Alter	Gallensteine	An der Galle
	Haben / hatten Sie	verstorben	bzw. Alter bei Todeszeitpunkt	festgestellt	operiert?
(Lebens-) Ehepartner	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mutter	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vater	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bruder 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bruder 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bruder 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schwester 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schwester 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schwester 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tochter 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tochter 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sohn 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sohn 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Haben Sie weitere Kinder oder Geschwister, und wer davon hat / hatte Gallensteine?

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Clemens Schafmayer, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, UKSH, Campus Kiel, der mir unermüdlich mit Rat und Tat zu jeder Tages- und Nachtzeit zur Seite stand und auch, als die Fertigstellung dieser Dissertation in weite Ferne gerückt war, nicht die Geduld mit mir verloren hat.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Jochen Hampe, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, UKSH, Campus Kiel, bedanken, dass er mir dieses Promotionsthema überlassen hat. Bei der Arbeit stand er stets mit kompetentem Rat oder auch mit konstruktiver Kritik zur Seite und war bei offenen Fragen stets ansprechbar.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Schreiber, Institut für Klinische Molekularbiologie, UKSH, Campus Kiel, und vor allem seinen Mitarbeitern im Labor, die die Geduld aufgebracht haben, mich in die Geheimnisse der DNA-Extraktion einzuweihen und darüber hinaus jederzeit mit Unterstützung zur Seite standen.

Auch bedanke ich mich beim gesamten **popgen** –Team für die Unterstützung und Hilfe in allerlei auftretenden Fragen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, Bärbel und Werner, für die moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die mein Studium und somit auch diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Freundin, Mareike Conring, für ihren Beistand in schwierigen Phasen dieser Arbeit.

9 Lebenslauf

Name	Soeren Lieb
Geburtsdatum	23.05.1978
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1984 – 1988	Grundschule Henstedt
1988 – 1995	Gymnasium Henstedt-Ulzburg
1995 – 1998	Berufliche Schule des Kreises Segeberg in Norderstedt Fachgymnasium, technischer Zweig

Zivildienst

07/1998 – 07/1999	Paracelsus Klinik Henstedt-Ulzburg, Chirurgie
-------------------	---

Wartezeit

08/1999 – 09/2000	Pflegetätigkeit in der Paracelsus Klinik Henstedt-Ulzburg während der Wartezeit auf den Studienplatz
-------------------	--

Hochschulstudium:

10/2000 – 05/2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
03/2003	Ärztliche Vorprüfung
Seit 01/2005	Beginn der Promotionsarbeit mit dem Thema: „Untersuchung der <i>Lith1</i> Kandidatengene <i>ABCB11</i> und <i>LXRA</i> bei der humanen Gallensteinerkrankung“ in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie UKSH, Campus Kiel
09/2006	Veröffentlichung in Hepatology (Sep.2006;44 (3):650-7)
02/2006 – 01/2007	Praktisches Jahr
05/2007	Ärztliche Prüfung
seit 12/2007	Assistenzarzt in der Sana-Kliniken Lübeck GmbH, Abteilung für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerzmedizin, Chefärztin Prof. Dr. med. Petra Saur